N° d'ordre :

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE DE GRENOBLE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques NACHBAUR

SUJET

Phospholipases A liées aux membranes subcellulaires de foie de rat. Renouvellement des Phospholipides mitochondriaux.

Soutenue le *1972, devant la Commission d'Examen*

JURY

MM. G DESSAUX *Président*

J. PELMONT
P. DESNUELLE *Examinateurs*
M^me^ P. VIGNAIS

N° d'ordre :

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE DE GRENOBLE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques NACHBAUR

SUJET

Phospholipases A liées aux membranes subcellulaires de foie de rat. Renouvellement des Phospholipides mitochondriaux.

Soutenue le *1972, devant la Commission d'Examen*

JURY

MM. G DESSAUX *Président*

J. PELMONT
P. DESNUELLE
M^me^ P. VIGNAIS
} *Examinateurs*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE
ET MEDICALE DE GRENOBLE

LISTE DES PROFESSEURS

Président : Monsieur Michel SOUTIF
Vice-Président : Monsieur Gabriel CAU

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	ANGLES D'AURIAC Paul	Mécanique des fluides
	ARNAUD Georges	Clinique des maladies infectieuses
	ARNAUD Paul	Chimie
	AUBERT Guy	Physique
	AYANT Yves	Physique approfondie
Mme	BARBIER Marie-Jeanne	Electrochimie
MM.	BARBIER Jean-Claude	Physique expérimentale
	BARBIER Reynold	Géologie appliquée
	BARJON Robert	Physique nucléaire
	BARNOUD Fernand	Biosynthèse de la cellulose
	BARRA Jean-René	Statistiques
	BARRIE Joseph	Clinique chirurgicale
	BENOIT Jean	Radioélectricité
	BERNARD Alain	Mathématiques Pures
	BESSON Jean	Electrochimie
	BEZES Henri	Chirurgie générale
	BLAMBERT Maurice	Mathématiques Pures
	BOLLIET Louis	Informatique (IUT B)
	BONNET Georges	Electrotechnique
	BONNET Jean-Louis	Clinique ophtalmologique
	BONNET-EYMARD Joseph	Pathologie médicale
	BONNIER Etienne	Electrochimie Electrométallurgie
	BOUCHERLE André	Chimie et Toxicologie
	BOUCHEZ Robert	Physique nucléaire
	BRAVARD Yves	Géographie
	BRISSONNEAU Pierre	Physique du Solide
	BUYLE-BODIN Maurice	Electronique
	CABANAC Jean	Pathologie chirurgicale
	CABANEL Guy	Clinique rhumatologique et hydrologie
	CALAS François	Anatomie
	CARRAZ Gilbert	Biologie animale et pharmacodynamie
	CAU Gabriel	Médecine légale et Toxicologie
	CAUQUIS Georges	Chimie organique
	CHABAUTY Claude	Mathématiques Pures
	CHARACHON Robert	Oto-Rhino-Laryngologie
	CHATEAU Robert	Thérapeutique
	CHENE Marcel	Chimie papetière
	COEUR André	Pharmacie chimique
	CONTAMIN Robert	Clinique gynécologique
	COUDERC Pierre	Anatomie Pathologique
	CRAYA Antoine	Mécanique
Mme	DEBELMAS Anne-Marie	Matière médicale
MM.	DEBELMAS Jacques	Géologie générale
	DEGRANGE Charles	Zoologie
	DESSAUX Georges	Physiologie animale
	DODU Jacques	Mécanique appliquée
	DOLIQUE Jean-Michel	Physique des plasmas

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544309_0042

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	BULLEMER Bernhard	Physique
	HANO JUN-ICHI	Mathématiques Pures
	STEPHENS Michaël	Mathématiques Appliquées

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BEAUDOING André	Pédiatrie
Mme	BERTRANDIAS Françoise	Mathématiques Pures
MM.	BERTRANDIAS Jean-Paul	Mathématiques appliquées
	BIAREZ Jean-Pierre	Mécanique
	BONNETAIN Lucien	Chimie minérale
Mme	BONNIER Jane	Chimie générale
MM.	CARLIER Georges	Biologie végétale
	COHEN Joseph	Electrotechnique
	COUMES André	Radioélectricité
	DEPASSEL Roger	Mécanique des Fluides
	DEPORTES Charles	Chimie minérale
	DESRE Pierre	Métallurgie
	GAUTHIER Yves	Sciences biologiques
	GEINDRE Michel	Electroradiologie
	GERMAIN Jean Pierre	Mécanique
	GIDON Paul	Géologie et Minéralogie
	GLENAT René	Chimie organique
	HACQUES Gérard	Calcul numérique
	JANIN Bernard	Géographie
Mme	KAHANE Josette	Physique
MM.	MULLER Jean-Michel	Thérapeutique
	PERRIAUX Jean-Jacques	Géologie et minéralogie
	POULOUJADOFF Michel	Electrotechnique
	REBECQ Jacques	Biologie (CUS)
	REVOL Michel	Urologie
	REYMOND Jean-Charles	Chirurgie générale
	ROBERT André	Chimie papetière
	SARRAZIN Roger	Anatomie et chirurgie
	SARROT-REYNAULD Jean	Géologie
	SIBILLE Robert	Construction Mécanique
	SIROT Louis	Chirurgie générale
Mme	SOUTIF Jeanne	Physique générale

MAITRES DE CONFERENCES ET MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mle	AGNIUS-DELORD Claudine	Physique pharmaceutique
	ALARY Josette	Chimie analytique
MM.	AMBLARD Pierre	Dermatologie
	AMBROISE-THOMAS Pierre	Parasitologie
	ARMAND Yves	Chimie
	BEGUIN Claude	Chimie organique
	BELORIZKY Elie	Physique
	BENZAKEN Claude	Mathématiques Appliquées
	BILLET Jean	Géographie
	BLIMAN Samuel	Electronique (EIE)
	BLOCH Daniel	Electrotechnique
Mme	BOUCHE Liane	Mathématiques (CUS)

MM.	BOUCHET Yves	Anatomie
	BOUSSARD Jean-Claude	Mathématiques Appliquées
	BOUVARD Maurice	Mécanique des Fluides
	BRIERE Georges	Physique expérimentale
	BRODEAU François	Mathématiques (IUT B)
	BRUGEL Lucien	Energétique
	BUISSON Roger	Physique
	BUTEL Jean	Orthopédie
	CHAMBAZ Edmond	Biochimie médicale
	CHAMPETIER Jean	Anatomie et organogénèse
	CHIAVERINA Jean	Biologie appliquée (EFP)
	CHIBON Pierre	Biologie animale
	COHEN-ADDAD Jean-Pierre	Spectrométrie physique
	COLOMB Maurice	Biochimie médicale
	CONTE René	Physique
	CROUZET Guy	Radiologie
	DURAND Francis	Métallurgie
	DUSSAUD René	Mathématiques (CUS)
Mme	ETERRADOSSI Jacqueline	Physiologie
MM.	FAURE Jacques	Médecine légale
	GAVEND Michel	Pharmacologie
	GENSAC Pierre	Botanique
	GIDON Maurice	Géologie
	GRIFFITHS Michaël	Mathématiques Appliquées
	GROULADE Joseph	Biochimie médicale
	HOLLARD Daniel	Hématologie
	HUGONOT Robert	Hygiène et Médecine préventive
	IDELMAN Simon	Physiologie animale
	IVANES Marcel	Electricité
	JALBERT Pierre	Histologie
	JOLY Jean-René	Mathématiques Pures
	JOUBERT Jean-Claude	Physique du Solide
	JULLIEN Pierre	Mathématiques Pures
	KAHANE André	Physique générale
	KUHN Gérard	Physique
Mme	LAJZEROWICZ Jeannine	Physique
MM.	LAJZEROWICZ Joseph	Physique
	LANCIA Roland	Physique atomique
	LE JUNTER Noël	Electronique
	LEROY Philippe	Mathématiques
	LOISEAUX Jean-Marie	Physique Nucléaire
	LONGEQUEUE Jean-Pierre	Physique Nucléaire
	LUU DUC Cuong	Chimie Organique
	MACHE Régis	Physiologie végétale
	MAGNIN Robert	Hygiène et Médecine préventive
	MARECHAL Jean	Mécanique
	MARTIN-BOUYER Michel	Chimie (CUS)
	MAYNARD Roger	Physique du Solide
	MICHOULIER Jean	Physique (I.U.T. "A")
	MICOUD Max	Maladies infectieuses
	MOREAU René	Hydraulique (INP)
	NEGRE Robert	Mécanique
	PARAMELLE Bernard	Pneumologie
	PECCOUD François	Analyse (IUT B)
	PEFFEN René	Métallurgie
	PELMONT Jean	Physiologie animale
	PERRET Jean	Neurologie
	PERRIN Louis	Pathologie expérimentale
	PFISTER Jean-Claude	Physique du Solide

MM.	BOUCHET	Yves
	BOUSSARD	Jean-Claude
	BOUVARD	Maurice
	BRIERE	Georges
	BROUSSAU	François
	BRUCEL	Lucien
	BUISSON	Roger
	BUTEL	Jean
	CHAMBAZ	Edmond
	CHAMBERTIER	Jean
	CHIAVERINA	Jean
	CHIRON	Pierre
	COHEN-ADDAD	Jean-Pierre
	COLOMB	Maurice
	CONTE	René
	CROUZET	Guy
	DURAND	Francis
	DUSSAUD	René
Mme	FERRADOSSI	Jacqueline
MM.	FAURE	Jacques
	GAVEND	Michel
	GENSAC	Pierre
	GIDON	Maurice
	GRIFFITHS	Michael
	GROULADE	Joseph
	HOLLARD	Daniel
	HUGONOT	Robert
	IDELMAN	Simon
	IVANES	Marcel
	JAUBERT	Pierre
	JOLY	Jean-René
	JOUBERT	Jean-Claude
	JULIEN	Pierre
	KAHANE	André
	KUHN	Gérard
Mme	LALZEMOVICZ	Jeannine
MM.	LALZEMOVICZ	Joseph
	LAMOLA	Roland
	LE JUNTER	Noël
	LEROY	Philippe
	LOISEAUX	Jean-Marie
	LONCHAMPT	Jean-Pierre
	LUU DUC	Cuong
	MACHE	Régis
	MAGNAN	Robert
	MARECHAL	Jean
	MARTIN-BOUYER	Michel
	MAYNARD	Roger
	MICHOULIER	Jean
	NICOUD	Max
	MOREAU	René
	NECTOUX	Robert
	PARAMELLE	Bernard
	PECCOUD	François
	PERRIN	René
	PELMONT	Jean
	PERRET	Jean
	PERRIN	Louis
	PFISTER	Jean-Claude

	Anatomie
	Mathématiques Appliquées
	Mécanique des Fluides
	Physique expérimentale
	Mathématiques (IUT B)
	Energétique
	Physique
	Orthopédie
	Biochimie médicale
	Anatomie et organogénèse
	Biologie appliquée (ESPE)
	Biologie animale
	Spectrométrie physique
	Biochimie médicale
	Physique
	Radiologie
	Métallurgie
	Mathématiques (CUS)
	Physiologie
	Médecine légale
	Pharmacologie
	Botanique
	Géologie
	Mathématiques Appliquées
	Biochimie médicale
	Hématologie
	Hygiène et Médecine préventive
	Physiologie animale
	Electricité
	Histologie
	Mathématiques Pures
	Physique du Solide
	Mathématiques Pures
	Physique générale
	Physique
	Physique
	Physique
	Physique économique
	Electronique
	Mathématiques
	Physique Nucléaire
	Physique Nucléaire
	Chimie Organique
	Physiologie végétale
	Hygiène et Médecine préventive
	Mécanique
	Chimie (CUS)
	Physique du Solide
	Physique (I.U.T. "A")
	Mathématiques Appliquées
	Hydraulique (INP)
	Mécanique
	Pneumologie
	Analyse (IUT B)
	Métallurgie
	Physiologie animale
	Neurologie
	Pathologie expérimentale
	Physique du Solide

MM.	PHELIP Xavier	Rhumatologie
Mle	PIERY Yvette	Biologie animale
MM.	RACHAIL Michel	Médecine interne
	RACINET Claude	Gynécologie et obstétrique
	RICHARD Lucien	Botanique
Mme	RINAUDO Marguerite	Chimie macromoléculaire
MM.	ROMIER Guy	Mathématiques (IUT B)
	ROUGEMONT (DE) Jacques	Neuro-Chirurgie
	SHAN Jean Claude	Chimie Générale
	STIEGLITZ Paul	Anesthésiologie
	STOEBNER Pierre	Anatomie pathologique
	VAN CUTSEM Bernard	Mathématiques Appliquées
	VEILLON Gérard	Mathématiques Appliquées (INP)
	VIALON Pierre	Géologie
	VOOG Robert	Médecine interne
	VROUSSOS Constantin	Radiologie
	ZADWORNY François	Electronique

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

MM.	BOUDOURIS Georges	Radioélectricité
	CHEEKE John	Thermodynamique
	GOLDSCHMIDT Hubert	Mathématiques
	SIDNEY STUARD	Mathématiques Pures
	YACOUD Mahmoud	Médecine légale

CHARGES DE FONCTIONS DE MAITRES DE CONFERENCES

Mme	BERIEL Hélène	Physiologie
Mme	RENAUDET Jacqueline	Microbiologie

Fait le 16 Novembre 1971

SOMMAIRE

Pages

Principales abréviations utilisées

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel 4

II. Isolement et purification des organelles subcellulaires et de leurs membranes 6

A - Isolement des organelles subcellulaires 6

1/ Mitochondries
2/ Lysosomes
3/ Microsomes
4/ Membranes plasmiques

B - Purification des mitochondries et obtention des Tritosomes 9

C - Préparation des membranes mitochondriales 10

1/ Méthode de PARSONS et coll.
2/ Méthode de SCHNAITMAN et coll.

D - Dosage des protéines 11

1/ Méthode du biuret
2/ Méthode de FOLIN - LOWRY modifiée

III. Dosage des enzymes de référence 12

A - Cytochrome c oxydase 12
B - Monoamine oxydase 13
C - NADPH cytochrome c réductase 14
D - Glucose-6-phosphatase 14
E - Phosphatase acide 15
F - Aryl sulfatase 16
G - 5'-mono nucléotidase 16

Pages

IV. Préparation des substrats de la phospholipase A 16b

A - Phosphatidyléthanolamine de jaune d'oeuf 16b

B - Phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine de foie de rat marqués par du (^{32}P) phosphate 17

V. Analyse des lipides 19

A - Dosage colorimétrique du phosphore lipidique 19

B - Chromatographie en phase vapeur des acides gras 20

C - Chromatographie sur couche mince des phospholipides 23

D - Mesure de la radioactivité 24

VI. Inclusions pour microscopie électronique 25

CHAPITRE II : PREPARATION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE FOIE DE RAT 26

I. Méthodes d'évaluation de la pureté des différentes membranes subcellulaires 26

II. Purification des préparations mitochondriales 28

A - Méthode utilisant le Triton WR 1339 28

B - Méthode utilisant l'action de la digitonine 29

III. Préparation des membranes mitochondriales 30

A - Méthode de PARSONS et coll. 30

B - Méthode de SCHNAITMAN et coll. 33

IV. Discussion du chapître II 34

CHAPITRE III : ETUDE DES PHOSPHOLIPASES A DANS LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE FOIE DE RAT 36

I. Introduction 36

II. Mesure de l'activité phospholipasique 39

A - Utilisation de substrats radioactifs 39

B - Mesure des acides gras libérés 40

1/ Mesure des seuls acides gras

2/ Mesure simultanée des acides gras libérés et des phospholipides hydrolysés.

pages

III. Activités phospholipasiques dans les organelles subcellulaires 41

A - Cas des lysosomes 41

B - Cas des microsomes 46

C - Cas des membranes plasmiques 47

D - Cas des mitochondries 48

1/ Etude sur les mitochondries entières

2/ Localisation à l'intérieur de la mitochondrie

IV. Discussion du chapître III 54

CHAPITRE IV : PARTICIPATION DE LA PHOSPHOLIPASE A AU RENOUVELLEMENT DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES 59

I. Incorporation d'acide oléique dans la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine 59

A - Comparaison entre mitochondries et microsomes 59

B - Origine des enzymes catalysant l'incorporation d'acide oléique dans les préparations de membranes mitochondriales. 60

II. Formation des acides phosphatidiques et lysophosphatidiques 61

A - Par incorporation d'acide oléique 61

B - Rôle de la phospholipase A dans la formation d'acide lysophosphatidique 64

III. Discussion du chapître III et conclusion 65

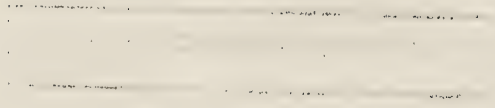
RESUME 67

BIBLIOGRAPHIE 71

PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

ALP	Acide lysophosphatidique
AMP, ADP, ATP	Adénosine-5'-mono, di et triphosphate
AP	Acide phosphatidique
CL	Cardiolipide
CoA	Coenzyme A
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique, sel de sodium
LPC	Lyso-phosphatidyl-choline
LPE	Lyso-phosphatidyl-éthanolamine
MAO	Monoamine oxydase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
PC	Phosphatidyl-choline
PE	Phosphatidyl-éthanolamine
PG	Phosphatidyl-glycérol
PI	Phosphatidyl inositol
P_i	Orthophosphate

INTRODUCTION



Les phospholipides sont les principaux constituants lipidiques des membranes biologiques (1-9) et, s'ils sont nécessaires pour que les processus biochimiques membranaires puissent avoir lieu, la manière dont ils interviennent reste en grande partie inconnue. L'étude de la distribution des phospholipases A dans les organelles subcellulaires a été entreprise parce qu'elle semblait être un moyen d'approche dans la recherche du rôle de ces phospholipides membranaires. En effet, parmi les phospholipases, celles de type A (E.C.3.1.1.4) semblent être les plus répandues dans le règne animal. D'autre part, l'activité des phospholipases A permet d'expliquer les observations faites à propos de certains phénomènes membranaires.

Par exemple, dans des conditions appropriées, les lysophosphatides qui apparaissent lors de l'attaque des phospholipides par la phospholipase A peuvent induire la transformation de la structure lamellaire d'une phase phospholipidique en une structure micellaire (10,11). Cette réorganisation favorise la fusion de membranes juxtaposées (12). De même, lors de l'infection d'une bactérie par un phage, il y a formation d'une importante quantité de lysophosphatides (13), composés qui provoqueraient une lyse partielle de la membrane bactérienne et faciliteraient ainsi la fixation du phage. Enfin, les processus de phagocytose qui permettent à la cellule et à certaines particules subcellulaires d'éliminer ou d'absorber des corps étrangers ne sont possibles que par des fusions intermembranaires, fusions qui pourraient être facilitées voire induites par l'action de la phospholipase A.

Un second exemple illustrant les possibilités d'action de la phospholipase A est fourni par l'étude des mitochondries. Lors du "vieillissement" des mitochondries dans une solution de saccharose isotonique on observe simultanément une perte du couplage entre l'oxydation de substrats et la phosphorylation de l'ADF, et une accumulation de lysophosphatidyl-éthanolamine et de lysophosphatidylcholine (14,15). Certains lipides, comme le phosphatidylinositol, non seulement restent intacts au cours du vieillissement, mais de plus sont

capables de prolonger "la vie" des mitochondries lorsqu'ils sont ajoutés à la suspension étudiée (14). Ces observations permettent de penser qu'une phospholipase A peut être impliquée dans le contrôle des réactions de l'oxydation phosphorylante (16) en modifiant discrètement la structure tridimensionelle du réseau protéo-lipidique constituant la membrane interne des mitochondries, structure nécessaire au fonctionnement des complexes enzymatiques catalysant cet ensemble de réactions (17).

Toujours dans le cas des mitochondries, les expériences de LEHNINGER et coll. (18) suggéraient l'existence d'une relation entre une activité phospholipasique et un phénomène membranaire : cet auteur montra en effet que le processus de gonflement des mitochondries induit par le calcium (ou la thyroxine) était accompagné du relâchement d'un facteur U (uncoupling factor) qui fut identifié à un mélange d'acide gras unsaturés. La contraction de ces mitochondries induite par l'ATP était accompagnée d'une incorporation d'acides gras dans les acides phosphatidiques et les céphalines (19). Ainsi les phospholipides semblaient être impliqués dans le contrôle physiologique de l'état fonctionnel des mitochondries. La libération d'acides gras induite par le calcium pouvait résulter de la dégradation des phospholipides, dégradation catalysée par des phospholipases A provenant soit des mitochondries soit d'autres parties de la cellule.

Si la phospholipase A apparait donc comme pouvant intervenir dans le fonctionnement des membranes biologiques, son rôle et son mode d'action ne peuvent être évalués que si l'on connaît la distribution des activités phospholipasiques parmi les organelles subcellulaires et en particulier leur localisation à l'intérieur même de ces organelles.

Ce genre d'étude nécessite la mise au point de techniques permettant d'obtenir et de caractériser des fractions subcellulaires aussi pures que possible. Ces problèmes sont examinés dans le premier chapître de cet exposé. Un intérêt particulier a été porté

aux mitochondries car ces organelles ont une faible activité phospholipasique dont la mesure peut être fortement perturbée par la présence d'autres organelles, même en quantités minimes.

Dans un second chapître, les diverses activités phopholipasiques A présentes dans les hépatocytes sont examinées et leur localisation à l'intérieur de la cellule déterminée.

Enfin dans un troisième chapître, un rôle possible de la phospholipase A mitochondriale a été recherché par l'étude de la réacylation des phospholipides mitochondriaux. En effet l'existence de cycles d'acylation-déacylation des phospholipides membranaires permettrait d'envisager un rôle actif pour ces molécules dans les propriétés des membranes.

Une partie des résultats présentés dans cette thèse a fait l'objet de notes et de communications préliminaires (20 - 30). D'autres laboratoires se sont également intéréssés aux phospholipases A du foie de rat. En particulier BJØRNSTAD (31), SCHERPHOF et coll. (32), WAITE et coll. (33) confirmèrent la présence d'une phospholipase A au sein des mitochondries et WAITE (34) par des méthodes différentes de celles présentées ici a étudié la répartition de cette enzyme entre les deux membranes mitochondriales. MELLORS et TAPPEL (35), RAHMAN et coll. (36), WAITE et coll. (37), STOFFEL et coll. (38), FRANSON et coll. (39), FOWLER et de DUVE (40) ont étudié les phospholipases des lysosomes, TORQUEBIAU-COLLARD et coll. (41), NEWKIRCK et coll. (42), VICTORIA et coll. (43), van GOLDE et coll. (44) celle des membranes plasmiques, BJØRNSTAD (45) et le laboratoire de van DEENEN (32,33) celle des microsomes.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

A. Principaux produits commerciaux

1/ Produits marqués

L'acide (^{14}C) oléique et le (^{32}P) phosphate provenaient du Département des radioéléments, Commissariat à l'Energie Atomique (91 - GIF-SUR-YVETTE)

2/ Produits non marqués

ATP, AMP	Sigma chemical Co St Louis, Miss., U.S.A
NADPH	Boerhinger Mannheim, R.F.A
CoA	P.L. Biochemical Inc. Milwankee, Wisc, U.S.A
Cytochrome c, type VI	Sigma Chemical Co St Louis, Miss, U.S.A
Benzylamine et paranitrophenyl phosphate	Prolabo France
Digitonine, A Grade	Calbiochem Los Angeles, Calif. U.S.A
Tritons X 100 et WR 1339	Rohm et Haas Philadelphie, Pa., U.S.A
Silica gel G, H et plaques pour T.L.C prêtes à l'emploi	E. Merck. Darmstadt, R.F.A

Esthers méthyliques d'acides gras et phase pour GLC	Applied Science State College, Pa.,U.S.A
Saccharose, Acide Silicique	Mallinckrodt Chem. Works St Louis, Miss.U.S.A

3/ Produits commerciaux

Grâce à la générosité de Mademoiselle Faure (Institut Pasteur) et du Professeur Barbu (CHU St Antoine, Paris) nous avons pu utiliser des phospholipides très purifiés comme témoins pour la chromatographie sur couche mince : cardiolipide, acide phosphatidique et (^{32}P) phosphatidyl-glycérol.

II. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES ORGANELLES SUBCELLULAIRES ET DE LEURS MEMBRANES

A. Isolement des organelles subcellulaires

1/ - Mitochondries

La méthode utilisée est essentiellement celle décrite par Hogeboom (46) et est basée sur le principe de la centrifugation différentielle.

Les rats sont de race albinos, d'un poids moyen de 200 grammes. L'animal est tué d'un coup sur la nuque et saigné. Le foie, prélevé rapidement, est immergé dans une solution glacée de saccharose 0,27 M dont le pH est ajusté à la valeur de 7,4 par le mélange Tris - HCl à la concentration finale 2 mM. Toutes les opérations ultérieures se font en chambre froide à + 4°C environ, en utilisant la solution de saccharose décrite ci-dessus.

Le foie est rapidement découpé en fragments de quelques millimètres de côté. Ces fragments sont lavés avec la solution de saccharose, puis introduits dans un homogénéiseur de Potter -Elvehjem* muni d'un piston en téflon. Le piston tournant à environ 1000 tours/minute est actionné deux ou trois fois. L'homogénat est ensuite dilué dans la solution de saccharose jusqu'à un volume de 50 ml par foie. Cet homogénat est soumis à une force de 600 g dans un rotor à angle de centrifugeuse Sorvall, type SS-1, pendant 10 minutes, ce qui permet la sédimentation des noyaux, des débris cellulaires et des hématies. Le surnageant contenant les mitochondries, les lysosomes et le réticulum endoplasmique est soumis à une force de 5000 g pendant 10 minutes, ce qui provoque la sédimentation des mitochondries.

---

* Arthur and Co., Philadelphia, U.S.A, homogénéiseur de type C ; l'intervalle entre le piston et le corps de l'homogénéiseur est de 150 à 230 µ.

Le culot mitochondrial ainsi obtenu est remis en suspension dans la solution de saccharose (30 ml par foie) et soumis à une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 6000 g. Deux autres lavages des mitochondries sont effectués à 6000 g durant 10 minutes et permettent d'éliminer la majorité des particules cytoplasmiques autres que les mitochondries et d'obtenir une préparation mitochondriale raisonnablement purifiée.

Le culot du dernier lavage est remis en suspension dans la solution de saccharose (1 à 2 ml par foie). La suspension ainsi obtenue est homogénéisée à la main avec l'homogénéiseur de Potter. Le rendement en protéines mitochondriales est généralement de l'ordre de 50 à 90 mg par foie.

2/ - Lysosomes

Les lysosomes, de dimensions assez comparables à celles des mitochondries et de densité légèrement plus faible, peuvent être sédimentés en centrifugeant le premier surnageant post-mitochondrial à 17 500 g durant 15 minutes (rotor Sorvall SS-1). Le culot ainsi obtenu constitue la fraction L. Un autre mode de préparation des lysosomes (les tritosomes ou fraction H) est décrit plus loin (voir page 9).

3/ - Microsomes

Le surnageant post-lysosomial est centrifugé à 30 000 tours/minute (Spinco, rotor 30) durant 30 minutes. Le culot de microsomes se présente sous la forme d'une gelée rouge. Le surnageant de cette centrifugation contient les protéines solubles du cytoplasme.

Cette fraction de microsomes est hétérogène : elle est constituée de réticulum endoplasmique lisse, de réticulum endoplasmique rugueux et est contaminée par des membranes plasmiques et des membranes provenant de l'appareil de Golgi. Le réticulum rugueux peut être obtenu sous une forme assez pure selon la méthode de MOLNAR (47) légèrement modifiée : 20 ml de la suspension de microsomes sont déposés au-dessus d'une couche de saccharose 1,3 M (20 ml) et après centrifugation à 25 000 tours/minute pendant 3 heures (Spinco, rotor SW-25-2), le réticulum rugueux est récupéré sous forme de culot. La présence de $MgCl_2$ 1 mM permet d'éviter la désagrégation du réticulum rugueux.

4/ - Membranes plasmiques

La méthode de NEVILLE (48) utilisée pour isoler les membranes plasmiques de foie de rat repose sur la faible densité de ces membranes comparativement à celle des autres organelles qui sont alourdies par les protéines non membranaires . Par centrifugation dans un milieu plus dense qu'elles, les membranes plasmiques remontent à la surface tandis que les noyaux, les mitochondries, etc..., restent au fond du tube. Les membranes obtenues par flottation sont ensuite purifiées par passage à travers un gradient de densité.

Mode opératoire :

Toutes les étapes de la préparation sont effectuées entre 0 et 4°C.

Huit foies de rat sont découpés en petits morceaux et rinçés dans une solution de bicarbonate de sodium 10^{-3} M. L'homogénéisation se fait à l'aide d'un homogénéiseur cylindrique en verre (Ten Brock type, Arthur Thomas and Co., Philadelphia, U.S.A) dont le piston est ajusté de façon assez lâche. Après 8 à 10 coups de piston manoeuvré à la main, l'homogénat est étendu à 800 ml avec du bicarbonate 1 mM, puis filtré sur quatre épaisseurs de gaze. Une centrifugation de 10 minutes à 1 500 g (rotor Sorvall SS-1) permet de séparer les protéines solubles des fractions particulaires. Les culots obtenus sont homogénéisés dans 400 ml de bicarbonate 1 mM et recentrifugés dans les mêmes conditions. Une remise en suspension s'effectue dans une solution de saccharose 69 % (p/p) (environ 68 ml) de telle sorte que le volume final soit de 75 ml et que la concentration en saccharose mesurée au réfractomètre soit de 44 % (p/p). Ces 75 ml sont répartis également dans trois tubes de centrifugeuse (Spinco, rotor SW-25-2) puis recouverts par 20 ml d'une solution de saccharose ajustée à l'aide d'un réfractomètre à 42,3 % (p/p). Après équilibration des tubes à 50 mg près, on centrifuge 150 minutes à 105 000 g. Les membranes plasmiques se rassemblent à la surface de la solution de saccharose sous forme d'une couche visqueuse que l'on peut récupérer à l'aide d'une petite spatule et que l'on remet en suspension dans 6 ml de bicarbonate 1 mM.

Cette suspension est placée au sommet de deux tubes (rotor Spinco SW 25-2), préalablement remplis par 4 ml de saccharose à 50 % (p/p) puis par un gradient linéaire de saccharose de 37 à 3 % (p/p). Après une heure de centrifugation à 550 g (2000 tours/minute), les membranes plasmiques se rassemblent à l'interface gradient-saccharose 50 % et sont recueillies par aspiration à l'aide d'une pipette Pasteur à bout recourbé. Cette fraction est remise en suspension dans 20 ml de bicarbonate 1 mM et centrifugée 20 minutes à 20 000 g (rotor Sorvall SS-1) en vue d'éliminer le saccharose.

On obtient ainsi à partir de huit foies de rat de 5 à 15 mg de protéines de membranes plasmiques.

B. Purification des mitochondries et obtention des tritosomes

Quatre jours avant l'expérience, on injecte à chaque rat par voie intrapéritonéale 170 mg de Triton WR 1339 (Rohm et Haas, Philadelphia, U.S.A) dissout dans 1 ml d'une solution saline isotonique. Les mitochondries sont ensuite isolées par la méthode classique de centrifugation différentielle.

5 ml de la suspension de mitochondries (concentration d'environ 50 mg/ml en protéines) sont placés au sommet d'un gradient de densité à deux couches de saccharose : 22 ml de saccharose à 41,4 % (p/v) et 22 ml à 39,3 % (p/v). La centrifugation se fait dans un rotor Spinco SW 25-2 à 23 500 tours/minute pendant 150 minutes. Deux fractions sont obtenues : l'une flotte au sommet du gradient et est principalement composée de lysosomes remplis de Triton WR 1339 (ou tritosomes) et probablement de membranes plasmiques, l'autre se rassemble sous forme de culot au fond du tube et est constituée de mitochondries. On peut obtenir davantage de tritosomes en déposant sur le gradient non pas une suspension de mitochondries mais la fraction L obtenue par centrifugation du premier surnageant post-mitochondrial (voir p. 7).

Par dialyse de la suspension de tritosomes pendant une nuit contre 4 l de $NaHCO_3$ 1 mM, EDTA 1 mM à pH 7,5, les tritosomes éclatent. Une centrifugation à 30 000 tours/minute durant 25 minutes (Spinco, rotor 30) permet alors de séparer les membranes de lysosomes des protéines lysosomiales solubles.

C. Préparation des membranes mitochondriales

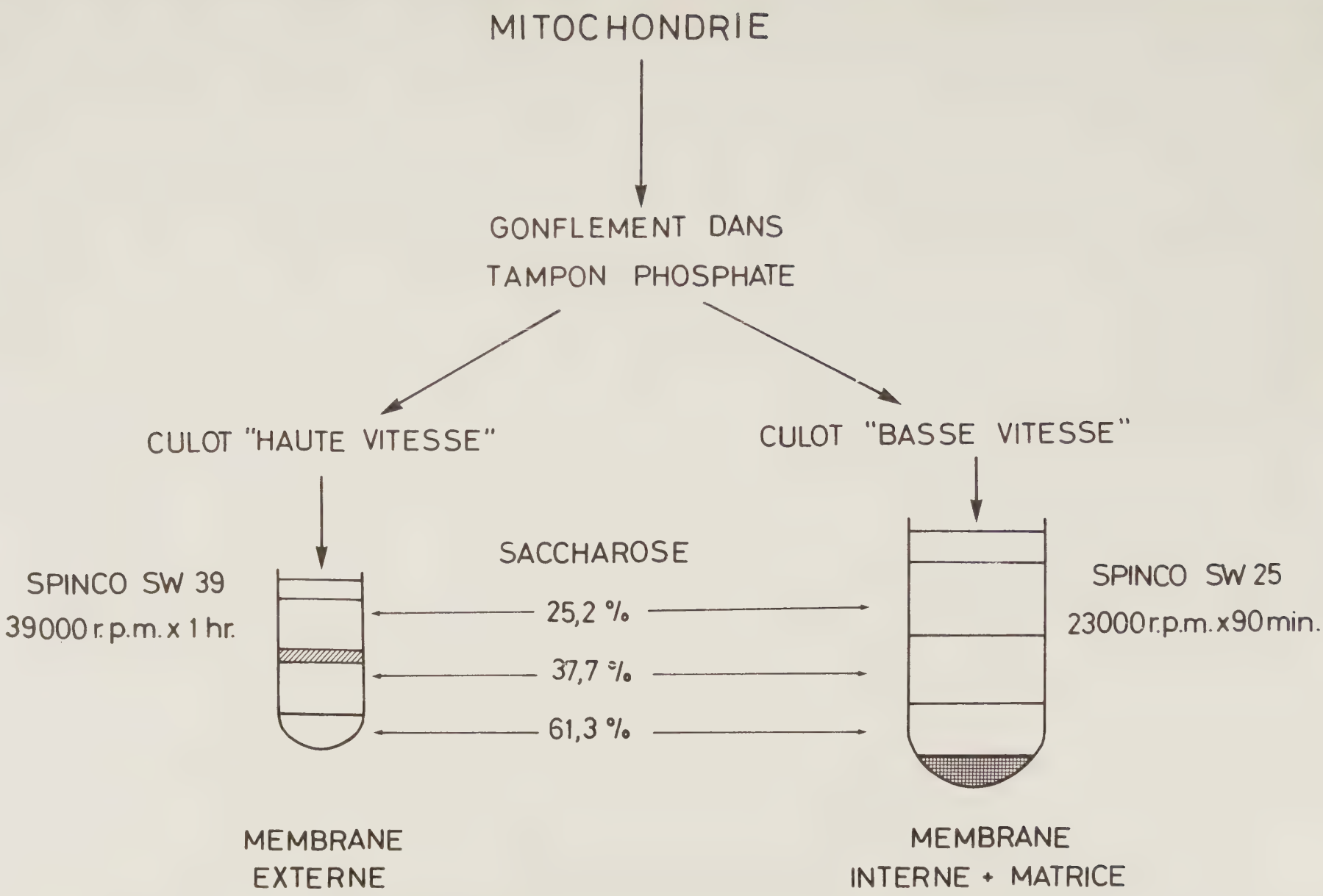
1/ - Méthode de PARSONS et coll. (49)

Les mitochondries de foie de rat sont mises en suspension dans un tampon phosphate hypotonique (20 mM, pH 7,4) et laissées durant 20 minutes à 0°C ce qui provoque un gonflement de ces particules et la rupture de la membrane externe. La quantité de tampon phosphate est en millilitres, 6 fois le nombre de milligrammes de protéines traitées. Cette suspension est ensuite centrifugée durant 20 minutes à 20 000 tours/minute (Spinco, rotor 30). Le culot obtenu est mis en suspension dans le même volume de tampon phosphate que précédemment, puis une centrifugation à 4 300 tours/minute durant 15 minutes (rotor Sorvall SS-1) permet de faire sédimenter les membranes internes contenant encore la matrice mitochondriale. Le surnageant contenant les membranes externes est centrifugé à 20 000 tours/minute ce qui permet d'obtenir un culot enrichi en membranes externes. Les deux fractions ainsi obtenues sont mises en suspension dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,4 et purifiées par passage à travers un gradient de densité discontinu. Ce gradient est réalisé par superposition de trois solutions de saccharose dans du tampon phosphate : 51,3 % (d = 1,192), 37,7 % (d = 1,142) et 23,2 % (d = 1,094). La centrifugation se fait dans des godets basculants soit avec un rotor Spinco SW 25-2 (23 500 tours/minute, 90 minutes) soit avec un rotor Spinco SW 39 (39 000 tours/minute, 45 minutes), selon les quantités de protéines à traiter (500 et 50 mg respectivement).

La figure 1 représente le schéma de cette séparation. A partir de huit foies de rat on obtient en moyenne 400 mg de membranes internes (plus matrice) et de 5 à 10 mg de membranes externes purifiées.

En mettant en suspension les membranes internes (plus matrice) dans un grand volume d'eau (100 ml par foie de rat) on provoque un éclatement de ces vésicules. Les protéines solubles de la matrice mitochondriale sont ensuite éliminées par centrifugation (20 000 g x 8 minutes, rotor Sorvall SS-1). Cette opération est répétée une seconde fois, puis les membranes obtenues sous forme de culot sont purifiées par centrifugation sur le gradient à trois couches de saccharose décrit précédemment (rotor SW 39, 1 heure à 30 000 tours/minute). La fraction qui se rassemble à l'interface des couches à 51 et 37 % de saccharose est consituée de membranes internes pratiquement dépourvues d'éléments matriciels.

FIGURE 1 : SCHEMA DE LA PREPARATION DES MEMBRANES INTERNES ET EXTERNES MITOCHONDRIALES SELON PARSONS ET COLL.


MITOCHONDRIE
GONFLEMENT DANS
TAMPON PHOSPHATE
CULOT "HAUTE VITESSE"
CULOT "BASSE VITESSE"
SPINCO SW 39
39000 r.p.m. x 1 hr.
SACCHAROSE
25,2 %
37,7 %
61,3 %
SPINCO SW 25
23000 r.p.m. x 90 min.
MEMBRANE
EXTERNE
MEMBRANE
INTERNE + MATRICE

2/ - Méthode de SCHNAITMAN et coll. (50)

La suspension mitochondriale dans du saccharose 0,27 M (100 mg de protéines/ml) est traitée par addition d'une solution de digitonine à 3 % dans du saccharose 0,27 M, de telle sorte que la concentration finale en digitonine soit inférieure à 1 % et que le rapport mg de digitonine/mg de protéines soit égal à 0,15. On laisse agir la digitonine durant 20 minutes à 0°C puis on dilue la suspension par 3 volumes de saccharose 0,27 M et on centrifuge 10 minutes à 9500 g (rotor Sorvall SS-1). Le culot ainsi obtenu est enrichi en membranes internes. Le surnageant est centrifugé 10 minutes à 20 000 tours/minute (Spinco rotor 30). Le culot (fraction P) est écarté et le surnageant recentrifugé 1 heure à 30 000 tours/minute (Spinco, rotor 30). Le nouveau culot obtenu est très enrichi en membranes externes.

A partir de huit foies de rat, on obtient en moyenne 450 mg de membranes internes et 5 mg de membranes externes.

D. Dosage des protéines

1/ - Méthode du biuret

La méthode modifiée de GORNALL et coll. (51) permet le dosage des protéines dans des préparations particulaires ; la modification consiste en l'addition de cholate de sodium qui solubilise les protéines membranaires.

Dans un tube à essai, on ajoute successivement et avec agitation après chaque addition :

- solution de cholate de sodium à 4 % (p/v) : 0,2 ml
- préparation examinée : de 0,020 à 0,1 ml correspondant à une quantité de protéines comprise entre 0,5 et 3 mg.
- solution de soude à 10 % : de 2,4 à 2,5 ml suivant la prise d'essai initiale
- solution de sulfate de cuivre à 1 % (p/v) : 0,3 ml.

On laisse une coloration violacée se développer durant 15 minutes. La lecture au spectrophotomètre se fait à 540 nm contre un "blanc" sans protéines. La quantité de protéines est estimée par rapport à une gamme

étalon de sérumalbumine (1 mg de sérumalbumine dans la prise d'essai donne une absorbance moyenne de 0,085 à 540 nm). Dans les cas où la suspension de particules reste encore légèrement turbide après addition de cholate et de soude, nous avons utilisé le procédé décrit par KROGER (52) basé sur la décoloration par le cyanure (10 mg) pour tenir compte de cette turbidité.

2/ - Méthode de FOLIN-LOWRY modifiée

Dans certains cas (faibles volumes des fractions obtenues ou faibles concentrations en protéines) la méthode de LOWRY (53) a été utilisée puisqu'elle permet de détecter jusqu'à 10µg de protéines dans une fraction aliquote. Nous avons utilisé la méthode modifiée par ZACH et COHEN (54) qui préconisaient le remplacement du réactif cuprotartrique par de l'EDTA cuivrique plus stable. Cette méthode estime la quantité de tyrosine présente dans les fractions testées.

Mode opératoire :

10 à 50µg de protéines sont dissouts dans 1 ml d'eau. 5 ml de réactif cuprique (EDTA cuivrique 125 mg, Na_2CO_3 10 g, NaOH 0,1 N qsp 500 ml) sont ajoutés et immédiatement après, 0,5 ml du réactif de FOLIN et CIOCALTEU (55). On laisse la coloration se développer pendant 30 minutes à l'obscurité, puis l'absorbance est mesurée à 660 nm contre un "blanc" de réactifs. Pour chaque dosage il est nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage à l'aide d'une série de tubes contenant des quantités connues de sérumalbumine.

Ce dosage n'est cependant applicable qu'à des solutions protéiques dont les concentrations en tampon Tris-HCl, Tris-Maléate ou triéthanolamine sont faibles, ces divers produits pouvant eux aussi réagir de façon positive.

III. DOSAGES DES ENZYMES DE REFERENCE

A. Cytochrome c oxydase (56) (E.C.1-9-3-1)

Principe :

La vitesse d'oxydation du ferrocytochrome c est mesurée en suivant la diminution de l'absorption due à la bande α à 550 nm.

Mode opératoire :

Le cytochrome c 41µM (0,54 mg/ml) dans de l'EDTA 1 mM et du tampon phosphate 0,03 M, pH 7,4, est réduit à 90 % par adjonction de petites quantités d'hydrosulfite de sodium.

La cuve de référence contient 3 ml de cette solution complètement réoxydée par une faible quantité de ferricyanure de potassium. Dans la cuve d'essai qui contient 3 ml de la solution de cytochrome c on ajoute au temps zéro la suspension protéique à tester convenablement diluée (à environ 1 mg de protéines/ml) dans le mélange suivant : Triton X-100 0,1 g/l, EDTA 1 mM, $NaHCO_3$ 1 mM. On mesure la diminution d'absorbance pendant 3 minutes à 550 nm, la température étant de 25°C.

La réaction étant d'ordre 1, la courbe log. (absorbance) = f (temps) est une droite dont la pente est égale à la constante de vitesse.

Définition de l'activité :

L'activité de la cytochrome c oxydase peut être définie par une constante de vitesse de réaction du premier ordre :

$$k = 2{,}3 \log \frac{\text{Absorbance au temps zéro}}{\text{Absorbance au temps 1 min.}}$$

L'activité spécifique est calculée à partir des concentrations connues de cytochrome c et de protéines dans le milieu d'essai et de la constante de vitesse calculée selon l'équation précédente.

$$\text{Activité spécifique} = \frac{k \times \text{concentration cytochrome c}}{\text{concentration de protéines}}$$

Note :

$$\epsilon_{\text{cytochrome c oxydé à 550 nm}} = 18{,}5.10^6 \text{ cm}^2/\text{mole}$$

B. Monoamine oxydase (57) (E.C 1.4.3.4.)

Principe :

La vitesse d'oxydation de la benzylamine est mesurée au spectrophotomètre en suivant la formation de benzaldéhyde :

$$H_2O + O_2 + C_6H_5CH_2\text{-}NH_2 \rightarrow C_6H_5 - CHO + H_2O_2 + NH_3$$

Mode opératoire :

Dans une cuve de quartz de 1 cm de chemin optique on solubilise la fraction à tester (environ 1 mg de protéines) par 0,02 ml d'une solution de Triton X-100 à 2 % (p/v). On ajoute 2,9 ml de tampon phosphate 30 mM à pH 7,5 et on fait démarrer la réaction par addition de 0,150 ml de benzylamine sulfate 0,1 M. On suit l'évolution de l'absorbance à 250 nm, en utilisant une cuve témoin contenant tous les réactifs sauf le substrat.

Le coefficient d'extinction moléculaire du benzaldéhyde étant de 13×10^6 cm^2/mole à 250 nm on peut donc calculer la quantité de benzaldéhyde formée par minute et par milligramme de protéines.

C. Dosage de la NADPH-cytochrome c réductase (58) (E.C.1.6.2.3.)

Principe :

Cette enzyme catalyse l'oxydation du NADPH, l'accepteur d'électrons étant le cytochrome c. La réduction du cytochrome c est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 550 nm.

Mode opératoire :

A environ 1 mg de protéines on ajoute 2,5 ml de tampon phosphate 60 mM pH 7,8, contenant du cytochrome c oxydé à la concentration de 0,12 mM, 0,1 ml de cyanure de potassium 9 mM, et de l'eau qsp 2,9 ml. La réaction commence après addition de 0,1 ml de NADPH 3 mM. La réduction du cytochrome c est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 550 nm. Le coefficient d'extinction moléculaire du cytochrome c oxydé étant $18,5 \times 10^6$ cm^2/mole à 550 nm on peut calculer la quantité de cytochrome c réduit par minute et par milligramme de protéine.

D. Dosage de la glucose - 6 - phosphatase (59) (E.C. 3.1.3.9.)

Principe :

Cette enzyme catalyse la réaction suivante :

$$H_2O + \text{glucose - 6 - phosphate} \longrightarrow \text{D-glucose} + H_3PO_4$$

Le phosphate libéré est dosé par "la méthode à l'élon".

Mode opératoire :

La fraction à tester (environ 1 mg de protéines) est mélangée à 0,2 ml de tampon histidine-HCL 0,1 M pH 6,5 et à 0,1 ml d'EDTA 0,01 M pH 6,5. La réaction commence après addition de 0,5 ml d'une solution de glucose - 6 - phosphate 0,08 M ajustée à pH 6,5 à l'aide d'acide chlorhydrique. Après incubation à 37°C durant 30 minutes, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml d'acide trichloracétique 8 % (p/v). Après filtration sur papier ou centrifugation (élimination du précipité de protéines), le phosphate libéré est mesuré sur une fraction aliquote de 1 ml par la méthode "à l'élon".

Dosage du phosphate minéral (60)

Dans des tubes à essai on ajoute successivement la prise d'essai, 0,6 ml de "molybdate acide " (5 g de molybdate d'ammonium, 40 ml H_2SO_4 10 N, eau qsp 100 ml), 0,5 ml d'un solution d'élon (p-méthyl aminophénol sulfate) (élon 1 g, bisulfite de sodium 3 g, eau qsp 100 ml) et de l'eau qsp 3,9 ml. On laisse la coloration se développer pendant 15 minutes.

L'absorbance est lue à 660 nm contre un témoin contenant dans un volume final de 3,9 ml, 0,6 ml de molybdate acide et 0,5 ml d'élon. L'étalonnage est effectué avec comme prise d'essai 0,5 ml de phosphate 1 mM (136 mg de KH_2PO_4/1).

E. Dosage de la phosphatase acide (61) (E.C. 3.1.3.2.)

Principe :

La phosphatase acide est une enzyme peu spécifique catalysant la réaction générale :

$$H_2O + R\text{-}O\text{-}\underset{\underset{OH}{|}}{\overset{\overset{O}{||}}{P}}\text{-}OH \longrightarrow R\text{-}OH + H_3PO_4$$

On utilise comme substrat le paranitrophénylphosphate . La réaction libère du paranitrophénol qui est jaune en milieu basique et que l'on dose spectrophotométriquement à 400 nm.

Mode opératoire :

Dans un tube à essai, la solution à tester (environ 0,1 mg de protéines) est dissoute par 0,02 ml d'une solution de Triton X 100 à 2 % (p/v). La réaction commence après addition de 1 ml d'une solution de paranitrophénylphosphate 0,05 M dans un tampon citrate 0, 1 M pH 4,8. Après incubation durant 5 minutes à 37°C, la réaction est stoppée par 4 ml de soude 0, 1 N. On lit l'absorbance à 400 nm contre un "blanc" ayant été incubé avec le substrat seul et auquel les protéines ont été ajoutées après l'addition de soude.

Le coefficient d'extinction moléculaire du paranitrophénol est $18,8 \times 10^6$ cm^2/mole à 400 nm.

F. Dosage de l'aryl-sulfatase (62) (E.C. 3.1.6.1.)

Principe :

Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sulfates de phénol. Le phénol libéré est jaune en milieu basique et peut être dosé spectrophotométriquement.

Mode opératoire :

La fraction à tester (environ 0,1 mg de protéines) est dissoute par 0,02 ml d'une solution de Triton X 100 à 2 %. La réaction commence après addition de 1 ml d'une solution de p-nitrocatéchol sulfate 0,005 M dans un tampon acétate 0,5 M de pH 5,2. Après incubation durant 30 minutes à 37°C, la réaction est arrêtée par 2 ml de soude 1 N. On lit l'absorbance à 515 nm contre un "blanc" ayant été incubé avec le substrat seul et auquel les protéines ont été ajoutées après l'addition de soude.

Le coefficient d'extinction moléculaire du p-nitrocatéchol est $12,4 \times 10^6$ cm^2/mole à 515 nm.

G. Dosage de la 5'-mononucléotidase (63) (E.C. 3.1.3.5.)

Principe :

Cette enzyme catalyse la réaction :

$$AMP + H_2O \longrightarrow \text{Adénosine} + H_3PO_4$$

Le phosphate libéré est dosé par la méthode à l'élon.

Mode opératoire :

La fraction à tester (0,2 à 0,5 mg de protéines) est mélangée à 0,05 ml d'une solution de Triton X-100 à 2 % (p/v). Sont ensuite ajoutés 0,05 ml d'une solution de chlorure de magnésium 0,16 M, 0,1 ml de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, et de l'eau qsp 0,9 ml. L'addition de 0,1 ml d'une solution de 5'-AMP 40 mM de pH 7,5 fait démarrer la réaction. Après incubation à 37°C durant 20 minutes, la réaction est arrêtée par 5 ml d'acide trichloroacétique 8 % (p/v). Une filtration ou une centrifugation permettent d'éliminer les protéines dénaturées. Le phosphate libéré est alors mesuré par la méthode à l'élon. Deux témoins sont nécessaires : l'un et l'autre contiennent tous les réactifs sauf respectivement le 5'-AMP et les protéines qui seront ajoutés après addition d'acide trichloroacétique, à la fin de l'incubation.

IV - PREPARATION DES SUBSTRATS DE LA PHOSPHOLIPASE A

A. Préparation de phosphatidyl-éthanolamine (PE) de jaune d'oeuf

Principe :

Cette préparation est essentiellement celle qui a été décrite par LEA et coll. (64). Le matériel de départ est formé de lipides de jaune d'oeuf insolubles dans l'acétone et purifiés par chromatographie sur colonne d'acide silicique. La phosphatidyl-éthanolamine est rapidement éluée par un mélange de chloroforme - méthanol (4:1 v/v). Une élution plus poussée permet d'obtenir la phosphatidyl-choline. Le jaune d'oeuf a été choisi comme matériel de départ car il contient très peu de phosphatidyl sérine, corps qui ne peut être séparé de la phosphatidyl-éthanolamine par la méthode de chromatographie utilisée.

Méthode :

Six jaunes d'oeuf sont homogénéisés dans un mélange de chloroforme-méthanol (2:1 v/v) pendant 30 secondes et le volume final du solvant est ensuite ajusté à 700 ml. L'homogénat est agité vigoureusement puis filtré par passage à travers un papier Whatman n° 1. Au filtrat sont ajoutés 280 ml de $CaCl_2$ 0,01 M. Après agitation, on laisse se séparer deux phases et la phase inférieure est récupérée puis passée à travers une colonne de poudre

de cellulose Whatman CF 11 de 3 - 4 cm de diamètre et 20 cm de hauteur. (La poudre de cellulose est en suspension dans du chloroforme). Cette colonne est ensuite lavée par 200 ml de chloroforme et les effluents de lavage sont ajoutés à la solution obtenue précédemment. Ce mélange ne contenant plus de contaminants non lipidiques est concentré sous pression réduite à 40°C jusqu'à un volume de 50 ml. Cette solution concentrée est ensuite ajoutée à 500 ml d'acétone refroidie préalablement à -10°C. Un précipité de phospholipides se forme rapidement et décante en quelques minutes. Ce précipité est ensuite dissout dans 100 ml d'éther puis traité à nouveau par 500 ml d'acétone à -10°C. Le nouveau précipité contient environ 0,25 g de phosphore lipidique. En vue de la chromatographie, il est dissout dans 50 ml d'un mélange chloroforme - méthanol (4:1 v/v).

Une colonne est préparée à partir de 200 g d'acide silicique (Mallinckrodt, 100 mesh) et 30 g de célite 545 dans un tube de 3 cm de diamètre. Le débit d'une telle colonne est d'environ 2 ml/minute. Après dépôt de la solution de lipides au sommet de la colonne, l'élution est faite par le mélange chloroforme - méthanol (4:1 v/v).

Si on collecte les effluents par fractions de 10 ml, la phosphatidyl-éthanolamine est éluée entre les fractions 50 et 63. Si on poursuit l'élution par du chloroforme - méthanol (3:2 v/v) on peut récupérer la phosphatidylcholine. Les fractions contenant la phosphatidyl éthanolamine pure sont réunies et le volume réduit à 30 ml par évaporation sous pression réduite à 40°C. 150 ml d'acétone froide sont ajoutés et le précipité est redissout dans du chloroforme et conservé au froid.

Cette méthode permet d'obtenir environ 500 mg de phosphatidyl-éthanolamine.

B. Préparation de phosphatidyl-éthanolamine et de phosphatidyl-choline marqués par ^{32}P

Principe :

Il a été montré (65) que le phosphate radioactif ^{32}P était incorporé in vivo dans les molécules de phospholipides de foie de rat. Les vitesses d'incorporation n'étant pas les mêmes pour les différents phospholipides, on ne peut donc obtenir par expérience qu'une catégorie de

phospholipides ayant une radioactivité spécifique appréciable : cardiolipides et acides phosphatidiques deviennent rapidement radioactifs (1 à 2 heures) puis perdent leur radioactivité, tandis que phosphatidylcholine et phosphatidyl-éthanolamine ne deviennent notablement marqués qu'après huit heures.

Mode opératoire :

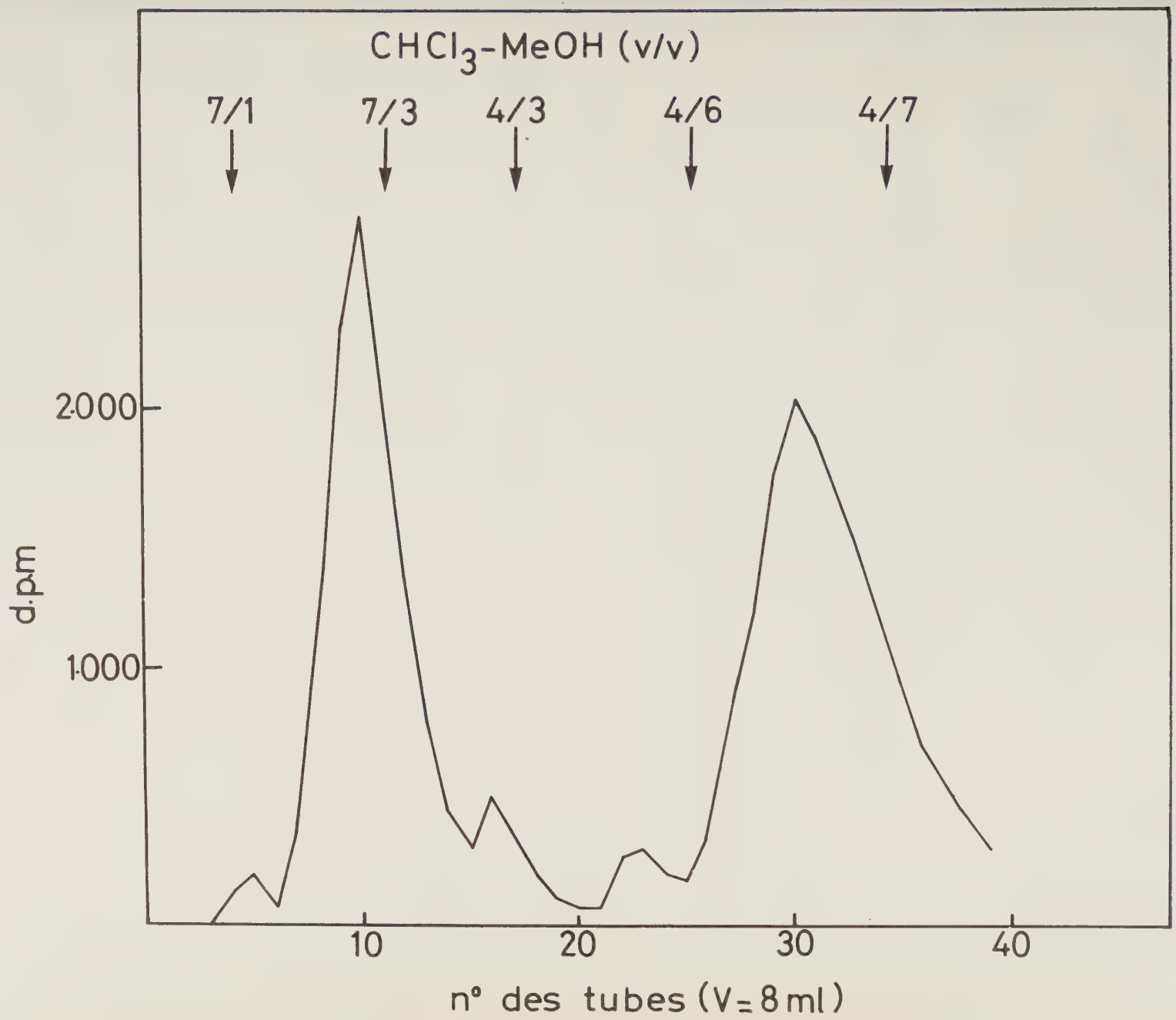
Deux rats reçoivent chacun par injection intrapéritonéale 1 mCie de phosphate (^{32}P)dilué dans 1 ml d'une solution saline isotonique (KCl 0,12 M) neutralisée par du bicarbonate de sodium. Huit heures plus tard, en mettant les animaux dans une atmosphère saturée d'éther éthylique, on provoque leur mort en évitant ainsi toute projection de sang ou d'urine fortement radioactifs.

Les foies sont prélevés puis découpés en petits morceaux qui sont rinçés abondamment avec de l'eau distillée. Après homogénéisation dans le minimum d'eau (environ 15 ml) à l'aide d'un homogénéiseur de Potter, les lipides sont extraits par 300 ml du mélange chloroforme-méthanol (2:1 v/v) et lavés selon la méthode de FOLCH et coll. (66) : après 5 minutes d'agitation le mélange est filtré sur papier filtre ordinaire puis lavé par 40 ml d'une solution de chlorure de sodium 0,1 M. La phase inférieure obtenue par décantation est séchée par passage sur du sulfate de sodium puis concentrée sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif type Büchi. Le résidu est dissout dans 10 ml de chloroforme puis déposé au sommet d'une colonne remplie d'un mélange acide silicique 100 mesh - Célite 545,(20 et 8 g respectivement) en suspension dans du chloroforme. L'élution des phospholipides est réalisée à l'aide d'une série de mélanges chloroforme - méthanol comme le montre la figure 2,l'éluat étant collecté par fractions de 8 ml.

Les tubes contenant des produits radioactifs sont ensuite analysés par chromatographie sur couche mince. Après réunion des tubes ne contenant qu'un seul phospholipide, la solution est concentrée et analysée pour son contenu en phosphore lipidique (méthode de Bartlett) et sa radioactivité (par scintillation).

FIGURE 2 : SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE DE (^{32}P) PHOSPHOLIPIDES DE FOIE DE RAT

Colonne de 1 cm de diamètre, 15 g d'acide silicique, 5 g de de Célite 545


CHCl3-MeOH (v/v)
7/1
7/3
4/3
4/6
4/7
2.000
1.000
d.p.m
10
20
30
40
n° des tubes (V=8 ml)

Le rendement d'une préparation est en moyenne le suivant :

- Phosphatidyl-éthanolamine : 2,2 mg de phosphore lipidique (0,074 nmoles ou 60 mg de PE) la radioactivité spécifique étant de 215 000 dpm/mole.

- Phosphatidyl-choline : 4,5 mg de phosphore lipidique (0,144 nmoles ou 115 mg de PC), la radioactivité spécifique étant de 171 000 dpm/mole. La pureté des produits obtenus est environ 96 % pour la PE et 99 % pour la PC.

4. ANALYSE DES LIPIDES

A. Dosage colorimétrique du phosphore lipidique (67)

Principe :

On mesure à 830 nm l'absorbance d'un complexe phosphomolybdique après minéralisation humide de l'échantillon.

Solutions : H_2O_2 30 volumes

H_2SO_4 10 N

Molybdate d'ammonium 0,22 %

Réactif de FISKE-SUBBAROW : on dissout 30 g de $NaHSO_3$ dans 200 ml d'eau distillée. Après addition de 0,5 g d'acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique et agitation durant 15 minutes, le mélange est filtré. A l'éluat clair on ajoute 1 g de Na_2SO_3. Cette solution peut se conserver deux mois à + 4°C.

Solution standard de KH_2PO_4 (0,1 mg de P_i/ml)

Méthode :

L'échantillon à doser est évaporé à sec. Après addition de 0,5 ml de H_2SO_4 10 N, on chauffe dans un minéraliseur électrique WTW à 250°C pendant 30 minutes. La minéralisation est alors accélérée par addition de quelques gouttes d'eau oxygénée à 30 volumes. L'excès d'eau oxygénée est ensuite éliminé par chauffage à 250°C durant 10 minutes.

Après refroidissement on ajoute 5 ml de molybdate d'ammonium 0,22 % et 0,25 ml de réactif de FISKE-SUBBAROW . La coloration est développée par chauffage au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. L'absorbance est mesurée à 830 nm contre un "blanc" de réactifs ayant subi le même traitement que l'échantillon. La gamme de tubes contenant des fractions aliquotes de la solution standard (de 1 à 8µg de P_i par tube) subit elle aussi toutes ces opérations, minéralisation comprise. Dans ces conditions, 5µg de P_i donnent une absorbance d'environ 0,800.

B. Chromatographie en phase vapeur des acides gras

Principe :

Dans toute chromatographie le fractionnement est réalisé par entrainement différentiel par un solvant (phase mobile) de substances solubilisées dans une phase stationnaire maintenue sur un support. Dans le cas présent la phase mobile est un gaz et la phase stationnaire un liquide non volatil absorbé sur une poudre inerte.

Pour être analysés par chromatographie en phase vapeur les acides gras sont transformés au préalable en esters le plus souvent méthyliques. En effet ces dérivés sont plus volatils que les acides gras libres et d'autre part ne s'associent pas entre eux ni ne forment de complexes avec la phase liquide, phénomènes qui créeraient une assymétrie des pics enregistrés à la sortie de l'appareil (68).

Méthode :

Les analyses ont été faites avec un chromatographe en phase vapeur Hewlett-Packard 5750 B équipé de détecteurs à ionisation de flamme. La surface des pics obtenus a été évaluée soit manuellement(planimétrie par la méthode dite de triangulation) soit automatiquement à l'aide d'un intégrateur Hewlett-Packard 3370 A .

Les colonnes utilisées étaient en acier inoxydable de 1/8" de diamètre extérieur et de longueur 2 m remplies de chromosorb WAW de granulométrie 100 mesh imprégné de DEGS (diéthylène glycol succinate) au taux de 20 %. Ce taux est obtenu en mettant en suspension 25 g de chromosorb WAW dans 200 ml d'une solution chloroformique de DEGS (5 g).

puis en faisant lentement évaporer le solvant tout en agitant doucement afin d'obtenir une imprégnation homogène sans toutefois fragmenter les grains du support. Après séchage à 60°C, la poudre obtenue est introduite dans la colonne préalablement mise en forme selon les dimensions du four. Un remplissage homogène est réalisé en faisant vibrer cette colonne, une forte pression d'air comprimé étant appliquée à l'une de ses extrémités. 24 heures sont ensuite nécessaires au conditionnement de la colonne à la température maximale d'utilisation (195°C pour le DEGS).

Le nombre de plateaux théoriques des colonnes réalisées était en moyenne de 3000 ($N = 16 \left(\frac{dR}{w}\right)^2$, dR étant la distance séparant le pic du solvant du pic considéré, w étant la largeur à la base de ce pic) soit une hauteur entre plateaux d'environ 0,06 cm.

Le calcul de la quantité des différents acides gras dans un mélange a été fait soit par étalonnage direct de l'appareil pour chaque acide gras, soit en utilisant un standard interne. Pour ce dernier notre choix s'est porté sur l'acide heptadécanoïque qui est absent dans les échantillons biologiques que nous avons étudiés. Dans les meilleurs cas il a été possible de détecter jusqu'à 0,5 nmoles d'un acide gras donné soit environ 150 nanogrammes.

Les différents pics obtenus à partir d'un échantillon biologique ont été identifiés soit par comparaison avec des mélanges standards d'acide gras, soit à l'aide de la courbe $\log t_r = f$ (nombre d'atomes de carbone), courbe qui permet de calculer la longueur de chaîne équivalente du produit inconnu (68). Cette longueur de chaîne équivalente est ensuite comparée aux valeurs publiées par d'autres auteurs (69) ou à celles d'acides gras connus.

Préparation du diazométhane et méthylation des acides gras

9 ml d'une solution saturée de potasse alcoolique et 2,5 ml d'une solution alcoolique d'hydrazine hydratée (30 % p/v) sont placés

dans un ballon. L'addition lente de 4 ml du mélange chloroforme, alcool ethylique absolu (26:50 v/v) déclenche la production de diazométhane qui est entrainé par un courant d'azote. Le diazométhane est retenu par barbottage dans de l'éther éthylique froid.

La solution contenant les acides gras à analyser est évaporée à sec sous azote. Après addition de 3 gouttes d'alcool méthylique et de 1 ml de la solution éthérée de diazométhane, on laisse la réaction se poursuivre pendant 10 minutes à température ambiante. L'ensemble de ces opérations est répété une seconde fois. Après évaporation à sec, les esters méthyliques sont repris dans le volume désiré d'hexane et 1 à 4 µl de cette solution sont analysés par chromatographie en phase gazeuse.

C. Chromatographie sur couches minces de phospholipides

Le principe est celui de la chromatographie en général. Toutefois un facteur de plus intervient : la migration du front de la phase mobile. En effet la phase mobile est composée de différents solvants qui migrent chacun à une vitesse propre. La composition de la phase mobile varie donc en fonction du temps et en fonction du point considéré ce qui entraine que le R_f d'un soluté donné varie au cours du processus chromatographique. D'autre part des phénomènes de démixion des solvants au cours de la migration peuvent se produire, dans certains cas, ce qui pose alors des problèmes quant à la mesure des R_f (70).

Dans le cas de la séparation des lipides, la phase stationnaire est à base de silice : le silica gel G contenant du $CaSO_4$ comme liant est fortement "acide" c'est-à-dire capable de retenir des acides forts au point de départ, la phase mobile étant neutre. Il en est de même du silica gel H qui ne contient pas de liant. Cette silice peut être rendue moins active soit par imprégnation à un taux connu d'eau ce qui est techniquement difficile (71) soit par addition de $(NH_4)_2SO_4$ par exemple.

Les solvants utilisés peuvent être classés en fonction de leur effet éluant qui est en étroite relation avec leur polarité. Le tableau suivant classe quelques solvants par ordre de polarité croissante

(mesurée par la constante diélectrique à 20°C).

Solvant	Constante diélectrique
n-Hexane	1,89
Benzène	2,28
Ether éthylique	4,34
Chloroforme	4,80
Méthanol	33,62
Eau	80,37

Enfin dans un mélange de lipides, les hydrocarbures saturés ne sont pratiquement pas adsorbés et ainsi migrent très rapidement. L'adsorption des hydrocarbures non saturés croît avec le nombre de doubles liaisons, les doubles liaisons conjuguées ayant plus d'effet que celles isolées. Quant aux groupes fonctionnels, on peut les classer par ordre d'adsorption croissante :

CH_3, O-Alkyl, C = O, NH_2, OH, COOH.

Préparation des plaques

30 g de silica gel G sont mis en suspension dans 60 ml d'eau. L'adsorbant est étendu à l'aide d'un appareil Desaga en une couche de 0,25 mm sur des plaques de verre de dimensions 20 x 20 cm ou 16 x 20 cm. Dans le cas du silica gel H les proportions sont : 20 g de silica gel H et 56 ml d'eau, l'épaisseur étant de 0,5 mm. Les plaques sont ensuite activées par chauffage pendant 1 heure à 120°C.

Solvants utilisés

Phase 1 : séparation des phospholipides (33)

1ère migration : chloroforme, éther de pétrole, acide acétique (65 : 35 : 2 v/v)

2ème migration, à 2 cm en dessous de la première

chloroforme, méthanol, eau (65 : 35 : 4 v/v)

Phase 2 : séparation des phospholipides acides (72)

1ère migration : acétone, ether de pétrole (1 : 3 v/v)

2ème migration : à 2 cm en dessous de la première
méthanol, acide acétique, eau (65 : 13 : 8 : 0,3 v/v)

Phase 3 : séparation des phospholipides acides sur plaque désactivée avec $(NH_4)_2SO_4$

chloroforme, méthanol, ammoniaque 7 N (76 : 30 : 6 v/v)

Révélateurs

Les phospholipides contenant un groupement NH_2 libre sont révélés spécifiquement par pulvérisation d'une solution de ninhydrine (0,2 % dans du butanol saturé d'eau) et chauffage à 120°C.

La partie phosphate de la molécule réagit avec le réactif molybdique (10 ml HCl 1 N, 25 ml molybdate d'ammonium 4 %, 5 ml d'acide perchlorique à 60 % et eau qsp 100 ml) en donnant une coloration bleue.

D. Mesure de la radioactivité

Ces mesures ont été faites soit à l'aide de compteurs Geiger-Muller à faible mouvement propre (Intertechnique Mle RA 15) soit par scintillation, le liquide utilisé ayant la composition suivante : PPO (2-5-diphényle-oxazole) 6 g, POPOP (p-bis-(5-diphényloxasolyl)-benzène) 0,3 g, éthanol absolu 50 ml, naphtalène 100 g, dioxane qsp 1 l. Les comptages par scintillation ont été effectués soit à l'aide d'un appareil Unilux II Nucléar Chicago, soit avec un Tricarb (Packard) par les soins du Service de Protection et des Laboratoires de Haute Activité du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble.

5. INCLUSIONS POUR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Réactifs :

- glutaraldéhyde 1 % dans une solution de phosphate 0,1 M de pH 7,2
- acide osmique 2 % dans une solution de phosphate 0,1 M de pH 7,2
- éthanol
- oxyde de propylène
- Epon : epikote 812 85 ml, DDSA (anhydride dodecenyl succinique) 40 ml
  MNA (anhydride méthyl nadique) 53 ml
- DMP 30 (diméthyl aminoéthyl phénol)

Mode opératoire :

Environ 10 mg de la suspension protéique à analyser sont "fixés" par la solution de glutaraldéhyde à 2°C. Après une demi-heure de contact et centrifugation, l'échantillon est abondamment rinçé avec une solution de phosphate 0,1 M de pH 7,2 puis la fixation est complétée par action de l'acide osmique pendant une heure. La déshydratation est obtenue par deux lavages successifs avec de l'éthanol à 70° pendant 5 minutes, deux autres avec de l'éthanol à 90° pendant 10 minutes et trois autres avec de l'éthanol absolu pendant 20 minutes chacun. Cette déshydratation est achevée par action répétée d'oxyde de propylène, 3 fois pendant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite placés pendant 60 minutes dans un mélange à volumes égaux d'oxyde de propylène et d'Epon, puis pendant 60 minutes dans le mélange Epon 20 ml - DMP 30 0,3 ml, et enfin pendant 12 heures dans ce même mélange renouvelé. La polymérisation s'effectue à 60°C en 48 heures. Les coupes sont ensuite colorées par de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb et observées avec un microscope électronique Philips EM 300. Certaines inclusions ont été examinées dans le service du Professeur J. ANDRE (Faculté des Sciences , ORSAY).

CHAPITRE II

PREPARATION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE FOIE DE RAT

1. METHODES D'EVALUATION DE LA PURETE DES DIFFERENTES PREPARATIONS DE MEMBRANES SUBCELLULAIRES

Les mitochondries obtenues selon la méthode classique de HOGEBOOM (46) sont assez fortement contaminées par des membranes provenant d'autres organelles subcellulaires. Dans de nombreux cas, cette contamination n'est pas gênante pour l'étude de phénomènes que l'on sait être purement mitochondriaux : translocation des adénines nucléotides et phosphorylation oxydative par exemple. Cependant cette contamination devient un problème majeur dans l'étude du métabolisme des lipides mitochondriaux puisque la plupart des enzymes agissant sur les lipides sont essentiellement situées au niveau du réticulum endoplasmique et des lysosomes, principaux contaminants des préparations mitochondriales.

La pureté d'une préparation de particules subcellulaires peut être évaluée à l'aide d'enzymes de référence. La cytochrome c oxydase est spécifiquement localisée dans la membrane interne mitochondriale (73,74) ; la monoamine oxydase peut servir de référence pour la membrane externe mitochondriale (50) malgré les réserves de certains auteurs (75,76). La phosphatase acide et l'aryl-sulfatase sont caractéristiques des lysosomes (59, 77), la seconde enzyme étant entièrement soluble (78) contrairement à la première qui ne l'est que partiellement (78, 79) ; à l'heure actuelle on ne connaît pas encore d'enzyme qui soit exclusivement attachée à la membrane des lysosomes. Parmi les nombreuses enzymes caractéristiques du réticulum endoplasmique les plus couramment utilisées sont la glucose-6-phosphatase et la NADPH cytochrome c réductase (80-81). Si l'on calcule la contamination d'une préparation de mitochondries par les microsomes, on trouve des valeurs très différentes selon que l'on utilise l'une ou l'autre enzyme : environ 5 % avec la NADPH cytochrome c réductase et 12 % à l'aide de la glucose-6-phosphatase. La valeur plus élevée obtenue avec la glucose-6-phosphatase est due à l'action de phosphatases non spécifiques lors de la mesure de l'activité enzymatique (29). Ce fait nous a progressivement conduits à utiliser de préférence la NADPH cytochrome c réductase comme enzyme de référence pour les microsomes. Toutefois, BRUNNER et BYGRAVE (82) ont récemment suggéré que cette enzyme pouvait également se trouver au niveau de la membrane externe mitochondriale et que le cytochrome P 450 serait plus caractéristique des membranes du réticulum endoplas-

mique. Des mesures effectuées dans le laboratoire (28) ont montré que le cytochrome P 450 et la NADPH cytochrome c réductase donnaient des résultats très voisins quant à la quantité de microsomes présents dans une préparation de membranes externes mitochondriales.

Enfin la 5'-mononucléotidase caractérise les membranes plasmiques de foie de rat (63). La plupart des mesures de l'activité de cette enzyme ont été effectuées à pH 7,5 (63). Cependant, très récemment cette activité enzymatique a été mise en évidence également dans les lysosomes (83,84). Cette seconde activité se distingue de la précédente d'une part en raison de son pH optimum (6,5 au lieu de 8,5) et d'autre part en raison de l'effet inhibiteur du tartrate. Les contrôles qui ont été faits dans le laboratoire (30) ont permis de montrer que les membranes plasmiques que nous avons obtenues ne contiennent que peu de lysosomes puisque l'activité de la 5'-mononucléotidase acide est faible. Inversement la fraction H (tritosomes) n'a pratiquement pas d'activité 5'-mononucléotidase à pH 8,5. L'activité enzymatique mesurée à pH 7,5 dans une fraction subcellulaire autre que lysosomiale ou plasmatique permet donc seulement de détecter la présence de membranes plasmiques et de lysosomes sans que l'on puisse préciser d'avantage.

En utilisant ces enzymes de référence on constate (Tableau 1.) qu'une préparation classique de mitochondries est contaminée assez fortement par des lysosomes (plus de 1 %), des microsomes (5 %) et des membranes plasmiques (2 %).

Deux méthodes de purification des mitochondries ont été utilisées : l'une repose sur les différences de densité (naturelles ou provoquées) des diverses particules subcellulaires ; l'autre emploie la sensibilité plus ou moins grande des membranes subcellulaires à des agents chimiques tels que la digitonine.

T A B L E A U I

A) - Activités spécifiques des enzymes de référence dans les organelles subcellulaires qu'elles caractérisent

B) - Estimation de la purification des mitochondries (méthode au Triton WR 1339) à l'aide des valeurs des activités des enzymes de référence

	Cyt. c oxydase	M.A.O.	Phosphatase acide	Glucose-6 phosphatase	NADPH cyt.c réductase	5'-AMPase
	nmoles de produit formé/min./mg de protéines					
A) - Microsomes	-	-	-	190	82	-
Membranes plasmiques	-	-	-	-	-	1.100
Membranes de lysosomes	-	-	3.900	-	-	-
B) - Mitochondries brutes	1.340	5	60	30	8	32
Mitochondries purifiées (E_T)	1.810	6	22	14	3	22
Tritosomes (H_T)	230	0,6	914	95	3	404

2. PURIFICATION DES PREPARATIONS MITOCHONDRIALES

A. Méthode utilisant le Triton WR 1339

Cette méthode permet essentiellement d'éliminer les lysosomes. Comme l'ont montré WATTIAUX et coll. (85), il est possible de séparer les mitochondries des lysosomes en rendant ces derniers plus légers par absorption de Triton WR 1339, détergent non ionique. Ces auteurs avaient observé qu'après injection intraveineuse de Triton WR 1339, l'effet maximum était atteint le quatrième jour.

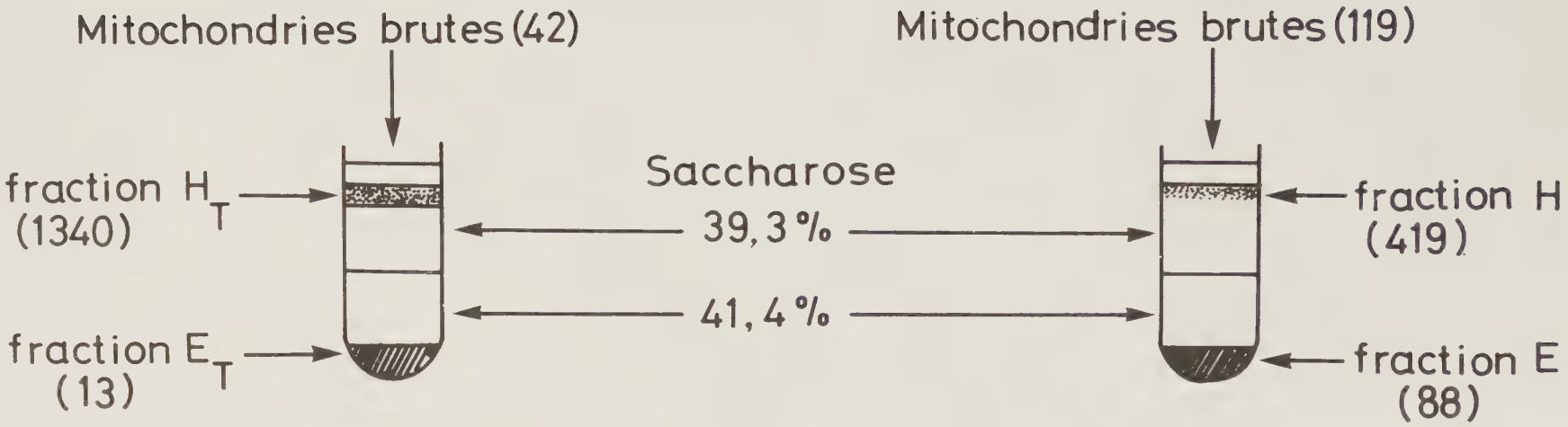
Au cours d'essais préliminaires, nous avons obtenu, après injection intrapéritonéale de Triton WR 1339, des résultats comparables sinon meilleurs qu'après injection intraveineuse. Etant de réalisation beaucoup plus aisées, les injections intrapéritonéales ont été faites trois à six jours avant les expériences. La densité des lysosomes passe alors de 1,19, valeur voisine de la densité des mitochondries, à environ 1,11. Il devient donc possible de séparer ces deux types de particules par passage à travers un gradient de saccharose comme cela est décrit au chapître I . Dans ces conditions, seules les mitochondries traversent le gradient et sédimentent au fond du tube.

La figure 3 montre les comportements respectifs de mitochondries provenant de rats traités par le Triton et de mitochondries provenant de rats témoins. On constate que dans le cas des rats témoins la contamination des mitochondries par les lysosomes n'est que très faiblement modifiée. Dans le cas des rats traités, cette contamination est diminuée d'un facteur trois et d'autre part on obtient une fraction extrêmement riche en lysosomes, ou plutôt tritosomes (Fraction H). Le tableau 1 B donne les valeurs des activités des enzymes de référence avant et après cette purification. Si l'activité des enzymes mitochondriales n'est que peu modifiée, celles de toutes les autres enzymes de référence sont abaissées, la diminution la plus importante étant observée pour la phosphatase acide.

FIGURE 3 : PURIFICATION DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE RAT APRES INJECTION INTRAPERITONEALE DE TRITON WR 1339

Les chiffres entre parenthèses indiquent les activités de la phosphatase acide (nmoles de p-nitrophényl phosphate hydrolys ming./mg prot.)

La centrifugation est effectuée à 23 500 tours/min. pendant 2 heures (Spinco, rotor SW 25-2).


Mitochondries brutes (42)
Mitochondries brutes (119)
fraction H_T (1340)
fraction E_T (13)
Saccharose
39,3 %
41,4 %
fraction H (419)
fraction E (88)
A - Rats traités avec Triton WR 1339
B - Rats témoins

Cette méthode présente malgré tout deux inconvénients. D'une part elle est longue et d'autre part les mitochondries purifiées (Fraction E_T) n'ont plus de contrôle respiratoire, ce qui indique qu'elles ont été sérieusement endommagées au cours du traitement. Par microscopie électronique nous avons constaté qu'environ 30 à 40 % des mitochondries de la fraction E_T avaient soit perdu leur membrane externe, soit étaient gonflées ; quant aux autres mitochondries, bien qu'elles aient un aspect voisin de celui des mitochondries de départ, leurs membranes probablement endommagées par le passage à travers une solution concentrée de saccharose (41 %) ne leur permettent plus de réaliser l'oxydation phosphorylante.

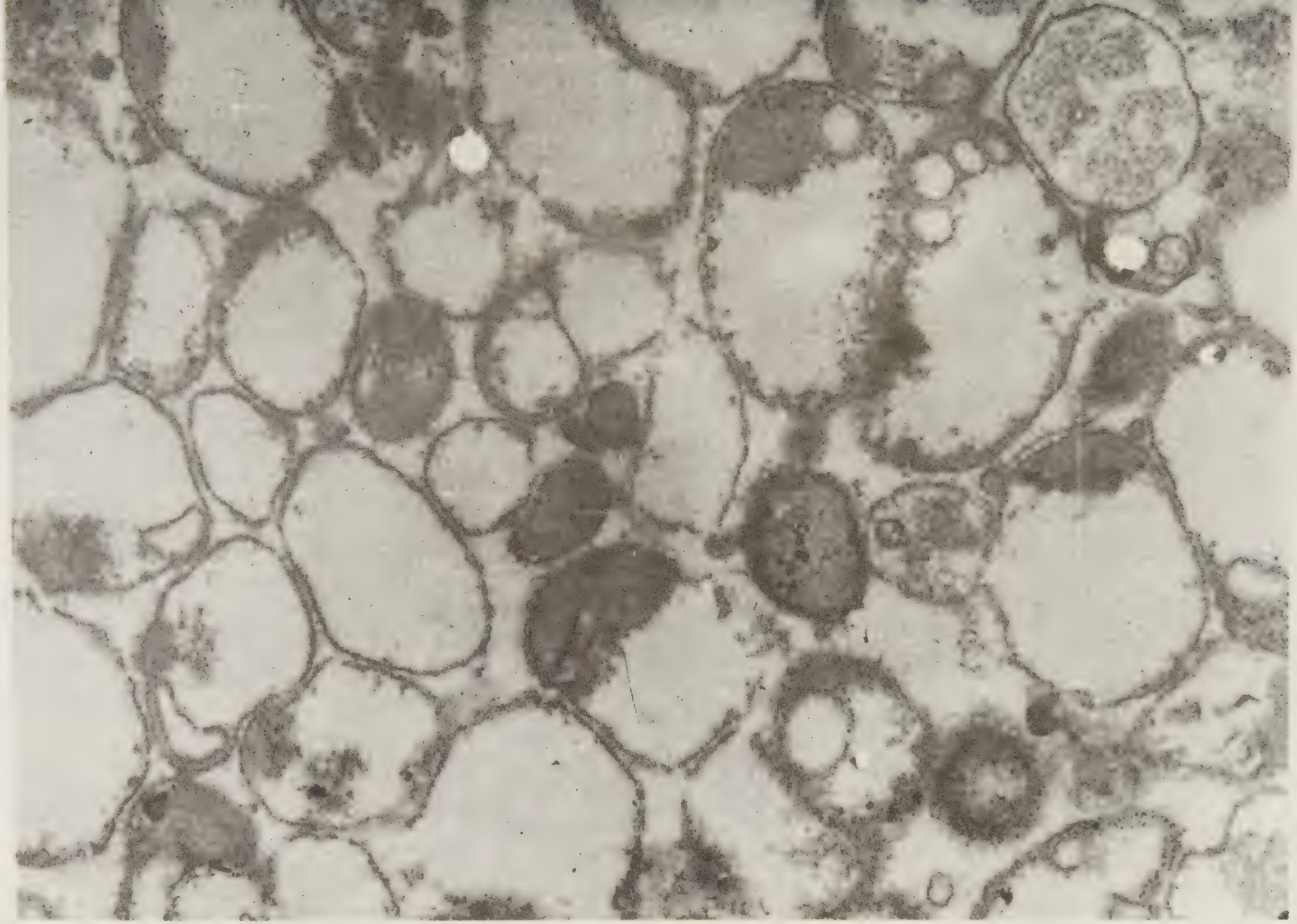
La fraction H (électromicrographie 1) apparaît homogène et essentiellement constituée d'organelles à une seule membrane, organelles que l'on peut identifier à des lysosomes compte tenu de la très forte activité phosphatasique acide de ces fractions.

B. Méthode utilisant l'action de la digitonine

Cette méthode est basée sur le fait que la digitonine peut se combiner spécifiquement au cholestérol pour former des complexes et ainsi briser l'organisation des membranes contenant ce stéroïde. Les membranes externes mitochondriales contenant peu de cholestérol ne seront donc que faiblement affectées par de très faibles concentrations de digitonine tandis que les membranes de lysosomes ou les membranes plasmiques réagiront beaucoup plus rapidement compte tenu de leur teneur élevée en cholestérol (29). La digitonine pourrait également se combiner aux phospholipides, mais aux très faibles concentrations où nous l'avons utilisée, le premier effet est très probablement prédominant.

Les mitochondries sont traitées durant 10 minutes à 0°C par une quantité de digitonine telle que la concentration finale soit d'environ 0,1 % et que le rapport mg de protéines/mg de digitonine soit inférieur à 0,03, puis diluées par 2 volumes de saccharose 0,27 M tamponné à l'aide du mélange Tris-HCl 3 mM à pH 7,4 et centrifugées durant 10 minutes à 10 000 g (rotor Sorvall SS-1). Le culot obtenu est

ELECTROMICROGRAPHIE 1 : TRITOSOMES (FRACTION H) OBTENUS APRES INJECTION INTRAPERITONEALE DE TRITON WR 1339 (x 45 000)



remis en suspension dans la solution de saccharose et recentrifugé dans les mêmes conditions.

Des études préliminaires (29) ont montré que la concentration optimale était de 0,25 mg de digitonine/10 mg de protéines. Dans ce cas les activités enzymatiques mitochondriales (monoamine oxydase et cytochrome c oxydase) (tableau 2) sont légèrement augmentées par le traitement tandis que les activités contaminantes sont en diminution notable à l'exception de celle de la NADPH cytochrome c réductase qui n'est que peu affectée. Par microscopie électronique nous avons pu vérifier que la structure des mitochondries ainsi purifiées n'est que peu modifiée ; d'autre part, après purification, les mitochondries ont le même contrôle respiratoire que celles de départ et les mêmes propriétés de gonflement dans un tampon phosphate. Cependant ce traitement doit modifier quelque peu les liens entre membrane interne et membrane externe car lors de la préparation de membranes externes à partir de mitochondries ainsi purifiées, on observe que le rendement en protéines est environ quatre fois plus faible qu'avec des mitochondries non traitées, comme si les membranes externes ne pouvaient plus se détacher des membranes internes.

Enfin, on note un enrichissement très important du surnageant (Fraction S) en phosphatase acide et 5'-mononucléotidase. Nous avons pu observer sur des électromicrographies de cette fraction la présence de fragments de réticulum rugueux et de membranes plasmiques.

3. PREPARATION DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES

A. Méthode de PARSONS et coll. (49)

Bien que l'existence de deux membranes dans les mitochondries soit connue depuis longtemps (86,87), ce n'est qu'assez récemment que des méthodes de séparation furent mises au point.

T A B L E A U II

Valeur des activités spécifiques des enzymes de référence dans les fractions obtenues après traitement des mitochondries par la digitonine (0,25 mg/10 mg de protéines).

	Cyt. c oxydase	M.A.O.	Phosphatase acide	NADPH cyt.c réductase	5'AMPase
	nmoles de produit formé/min./mg de protéines				
tochondries brutes	1792	4,5	100	11	8
tochondries purifiées	2390	5	20	9	5
rnageant post-mitochon-ial	39	ND*	454	19	19

*non détecté

La première méthode proposée fut celle de PARSONS et coll. (49). Cette méthode est basée sur l'observation (88) suivante : le gonflement des mitochondries de foie dans un tampon phosphate hypotonique entraîne une rupture de la membrane externe, tandis que la membrane interne se déplie sans se rompre. Par centrifugation différentielle et passages à travers des gradients de densité on peut alors séparer ces membranes comme décrit au chapître I (§ II-C).

Comme le soulignaient les auteurs de la méthode, les membranes externes ainsi isolées sont assez fortement contaminées par du réticulum endoplasmique (Tableau 3). On constate également que la contamination par les lysosomes est importante. Comme le montre l'expérience suivante, il est très difficile de séparer les membranes externes des membranes de lysosomes au moyen du gradient décrit par PARSONS. Des lysosomes allégés par le Triton WR 1339 (fraction H) sont traités exactement comme le sont les mitochondries : homogénéisation dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,3, et après 20 minutes à 0°C concentration par centrifugation à 20000 tours/minute (Spinco, rotor 30), puis dépôt au sommet d'un gradient à trois couches de saccharose (cf. chapître I) et centrifugation à 38000 tours/minute pendant 40 minutes (Spinco rotor SW 39). La fraction que l'on récupère à la première interface du gradient (fraction O de la figure 4), c'est-à-dire au même endroit que les membranes externes mitochondriales, est caractérisée par des activités de la phosphatase acide et de l'aryl sulfatase respectivement plus élevées et plus faibles que celles de la fraction H de départ. Ces variations indiquent un enrichissement en membranes de lysosomes et une perte des enzymes lysosomiales solubles, perte due à la rupture par choc osmotique de la membrane lysosomiale, fait qui a pu être confirmé par examen en microscopie électronique. Ces résultats sont en accord avec ceux de SAWANT et coll. (78) qui ont montré que l'aryl sulfatase était soluble à 100 % tandis que 44 % de la phosphatase acide étaient liés aux membranes de lysosomes. Parallèlement à cet enrichissement en membranes de lysosomes on retrouve l'enrichissement en microsomes (valeurs de l'activité de la glucose-6-phosphatase) remarqué par Parsons et coll. En effet si l'on centrifuge sur ce même gradient des microsomes ayant été traités de la même manière que les mitochondries

T A B L E A U III

Activités spécifiques des enzymes de référence dans des préparations de membranes mitochondriales obtenues selon PARSONS et coll. (93) à partir de mitochondries brutes

	Protéines	Cyt. c oxydase	M.A.O.	Phosphatase acide	NADPH cyt. c réductase	5'AMPase
	%	nmoles de produit formé/min./mg de protéines				
Mitochondries	100	2 500	5	65	4	25
Membranes internes plus matrice	77	7 000	2	8	1	4
Culot haute vitesse	12	600	30	225	20	140
Membrane externe	3	500	64	673	-	-

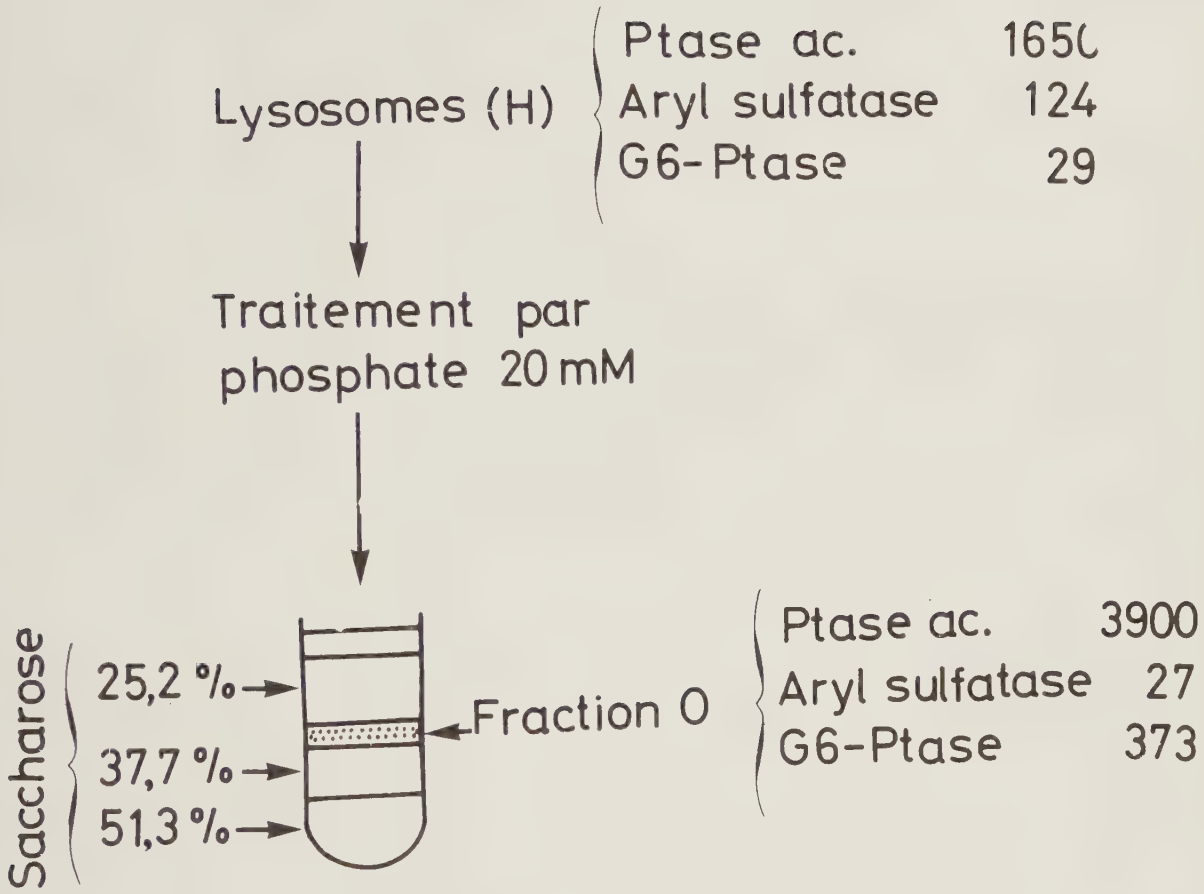


FIGURE 4 : COMPORTEMENT DES LYSOSOMES TRAITES SELON LA METHODE DE PARSONS

Les activités enzymatiques sont exprimées en nmoles de produit formé/min./mg de protéines

et que l'on mesure l'activité spécifique de la glucose-6- phosphatase dans le matériel protéique qui se rassemble à la première interface du gradient, on trouve que cette activité est bien supérieure (0,70 µ moles de P_i libéré/min./mg de protéines) à celle des microsomes de départ (0,24 µmoles de P_i/min./mg de protéines). Une telle augmentation d'activité ne peut s'expliquer que par un enrichissement en phosphatases non spécifique (cf. p.26) d'origine lysosomiale et indique que les membranes de réticulum endoplasmique ont des caractéristiques de sédimentation voisines de celles de la membrane externe mitochondriale et de la membrane lysosomiale.

La conclusion de ces expériences est que si le passage sur un gradient de saccharose permet de séparer les deux membranes mitochondriales, ce procédé est incapable de séparer les membranes externes des membranes de lysosomes ou de réticulum endoplasmique. Il est donc nécessaire de purifier les préparations de mitochondries avant d'entreprendre la purification des membranes externes mitochondriales.

Le tableau 4 donne les valeurs des activités des enzymes de référence dans des préparations de membranes mitochondriales obtenues par la méthode de Parsons et coll. à partir de mitochondries purifiées (E_T). La fraction formée par les vésicules de "membrane interne plus matrice" est totalement dépourvue d'activités enzymatiques contaminantes et le niveau de la contamination dans la fraction "membrane externe" est notablement abaissé. Les membranes internes figurant sur ce tableau ont été obtenues à partir des "membranes internes plus matrice" par traitement aux ultrasons (Branson sonifier, 10 Amp., 2 minutes) et passage sur gradient de saccharose. Ces membranes internes contenant peu de matrice mitochondriale se rassemblent à la première interface du gradient (en partant du sommet du tube). Ce fait permet de conclure que toutes les membranes d'organelles subcellulaires étudiées ici doivent avoir des densités relativement voisines et en tous cas inférieures à 1,14.

Si l'on emploie la méthode à la digitonine pour purifier les mitochondries, le rendement en membranes externes est beaucoup plus faible que précédemment et d'autre part la fraction "membrane interne plus matrice" possède une activité monoamine oxydasique assez

T A B L E A U IV

Activités spécifiques des enzymes de référence dans des préparations de membranes mitochondriales obtenues selon PARSONS et coll. (49) à partir de mitochondries purifiées (fraction E_T) par la méthode utilisant le Triton WR 1339.

	Cyt. c oxydase	M.A.O.	Phosphatase acide	Glucose-6 Phosphatase
	nmoles de produit formé /min./mg de protéines			
embranes internes lus matrice	2 200	5	ND*	ND*
embranes internes	2 100	4	1	1
embranes externes	40	107	194	45

* non détecté

forte (Tableau 5). Ces deux faits indiquent que la purification des mitochondries a endommagé les membranes de telle sorte que les liens entre membrane interne et membrane externe ont été modifiés. En effet en traitant la fraction "membrane interne plus matrice" par 1,5 mg de digitonine/10 mg de protéines, on n'observe pas de baisse de l'activité de la monoamine oxydase contaminante. Quant aux autres activités contaminantes elles restent du même ordre de grandeur.

Enfin on peut penser que la digitonine agissant sur une préparation de membranes externes pourrait éliminer une partie des lysosomes contaminants. Ce traitement effectué sur un "culot haute vitesse" provenant de mitochondries non purifiées provoque en effet une baisse de l'activité de la phosphatase acide (de 225 à 109 nmoles de p-nitrophénol libéré/min./mg de protéines) mais également de celle de la monoamineoxydase (de 30 à 10 nmole de benzaldéhyde formé/min./mg de protéines). Là encore on arrive à la conclusion qu'il est nécessaire de purifier les mitochondries de départ.

B. Méthode de SCHNAITMAN et coll. (50) (80)

Cette méthode décrite par LEVY et coll. (90) puis perfectionnée par SCHNAITMAN et GREENAWALT (50,80) utilise l'action de la digitonine dans des gammes de concentration bien définies pour éliminer la membrane externe mitochondriale qui, une fois détachée, peut être isolée par centrifugation différentielle.

Les préparations ont été effectuées à partir de mitochondries purifiées (E_T). Le tableau 6 montre que, si les activités contaminantes sont du même ordre de grandeur que celles obtenues en utilisant la méthode de Parsons, par contre la séparation entre membrane interne et membrane externe est moins nette. En conséquence, dans l'étude de la localisation de la phospholipase A mitochondriale, cette méthode n'a été utilisée qu'à titre de contrôle des résultats obtenus avec des membranes mitochondriales préparées selon la méthode de PARSONS.

T A B L E A U V

Activités spécifiques des enzymes de référence dans des préparations mitochondriales obtenues selon la méthode de PARSONS et coll. à partir de mitochondries purifiées par traitement à la digitonine.

	Protéines	Cyt. c oxydase	M.A.O	Phosphatase acide	NADPH cyt.c réductase	5'-AMPase
	%	nmoles de produit formé /min./mg de protéines				
Mitochondries purifiées	100	2 300	6,2	19	3	3
Membranes internes plus matrice	51	7 050	6	3	1	ND*
Culot haute vitesse	1,5	316	28	84	8	59
Membranes internes après 2nd traitement digitonique	45	6 900	5,8	4	ND*	ND*

*non détecté

T A B L E A U VI

Activités spécifiques des enzymes de référence dans des préparations mitochondriales obtenues selon SCHNAITMAN et coll. (50) à partir de mitochondries purifiées par la méthode utilisant le Triton WR 1339.

	Protéines	Cyt. c oxydase	M.A.O.	Phosphatase acide
	%	nmoles de produit formé /min./mg de protéines		
itochondries purifiées	100	1270	3,0	15
embranes internes	56	4760	3,1	3
raction intermédiaire P)	19	3600	6,2	14
embranes externes	3	1300	11,2	26
urnageant	16	ND*	1,5	43

* non détecté

Discussion du chapître II

Les expériences rapportées dans ce chapître montrent tout d'abord qu'il est pratiquement impossible d'obtenir des préparations de mitochondries totalement dépourvues de contaminants. Quelle que soit la méthode utilisée, il semble que l'on arrive à un taux minimum de contamination s'élevant à environ 2 % pour les microsomes, 0,5 pour les lysosomes et 0,5 à 1 % pour les membranes plasmiques, valeurs estimées d'après les activités spécifiques des enzymes de référence respectivement dans les fractions mitochondriales et dans les préparations purifiées autant que possible de membranes de lysosomes, de réticulum endoplasmique et de membranes plasmiques. Si ces valeurs permettent dans la plupart des cas de considérer ces contaminations comme négligeables dans le cadre d'expériences faites sur les mitochondries entières, elles restent malheureusement trop élevées si l'on envisage la préparation de membranes sub mitochondriales : il s'avère en effet que les membranes contaminantes de lysosomes ou de réticulum endoplasmique se comportent comme des membranes externes lors de la purification par passage sur un gradient de densité. Ceci avait été montré par PARSONS et coll. (74) en ce qui concerne les microsomes et s'étend également aux membranes de lysosomes. Un affinement des méthodes de purification (gradient de densité continu, électrophorèse en veine liquide) permettrait sans doute de diminuer ces contaminations mais la question du rendement final en protéines interdirait pratiquement toute manipulation ultérieure. D'autre part, comme cela se produit avec les mitochondries entières, un taux minimum serait vite atteint ceci étant dû à l'agglomération de membranes ayant somme toute des caractéristiques physiques et chimiques voisines.

Compte tenu du degré de pureté relatif du matériel biologique utilisé il convient donc d'être très prudent dans la localisation d'une enzyme sur un type de membrane. En particulier, en passant des mitochondries aux membranes externes, l'augmentation de l'activité spécifique d'une enzyme ne saurait à elle seule être la preuve que cette enzyme appartient exclusivement à la membrane externe. On voit la cause de la controverse actuelle quant à la présence ou non d'enzymes du métabolisme

des lipides au niveau de la membrane externe mitochondriale (91,92).

Entre les deux méthodes de purification des mitochondries proposées ici, la méthode utilisant la digitonine semble la meilleure. En effet elle permet une purification comparable tout en étant d'emploi plus aisé et surtout elle ne modifie apparemment pas l'état fonctionnel des mitochondries. Si nous avons préféré faire agir la digitonine directement sur les préparations mitochondriales plutôt que sur l'homogénat de foie de rat comme le propose LOEWENSTEIN (93), c'est afin d'éviter la formation de morceaux de membranes en grande quantité, morceaux qui seraient plus difficiles à éliminer que les organelles entières.

C H A P I T R E III

ETUDE DES PHOSPHOLIPASES A DANS LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE FOIE DE RAT

I. INTRODUCTION

La phospholipase A catalyse l'hydrolyse d'une liaison ester d'acide gras de la molécule phospholipidique. A priori, plusieurs modes d'action sont envisageables (Figure 5). La voie I conduit à la formation d'un lysophospholipide acylé en β : ce type de phospholipase autrefois appelé phospholipase B a été dénommé phospholipase A_1 (94). La voie II donne un lysodérivé acylé en α : il s'agit de la phospholipase A_2 (94). Aucune phospholipase capable à elle seule de catalyser la réaction III n'a encore été identifiée, un résultat identique pouvant également être obtenu par l'action conjuguée d'une phospholipase (A_1 ou A_2) et d'une lysophospholipase.

La première mention d'une activité phospholipasique date de 1914 et fut faite par DELEZENNE et FOURNEAU (95) qui travaillaient sur des venins de serpent. Depuis les phospholipases A de très nombreux venins de serpent ont été étudiées et purifiées (cf. bibliographie de la réf. 96). Les venins de scorpion, de guêpe et d'abeille (97) contiennent également cette enzyme. Toutes ces phospholipases sont de type A_2 comme cela a été montré par TATTRIE (98), HANAHAN (99), de HAAS (100) et LONG (101). Chez les bactéries, la présence de phospholipases A a été également démontrée (13,102,105). En ce qui concerne les mammifères, dès 1936 GRONCHI (106) mit en évidence une activité phospholipasique A dans le pancréas. Depuis, l'adoption des conditions expérimentales mises au point par MAGGEE et coll. (107) jointe à l'application des techniques de séparation des produits "lyso" formés au cours de la réaction enzymatique, ont permis l'étude détaillée du mode d'action des phospholipases A dans de nombreux tissus animaux (108 - 122).

Après la mise en évidence d'une activité phospholipasique A dans le foie de rat (115), les premiers rapports (123 - 124) concernant l'activité phospholipasique mitochondriale montrèrent que cette activité

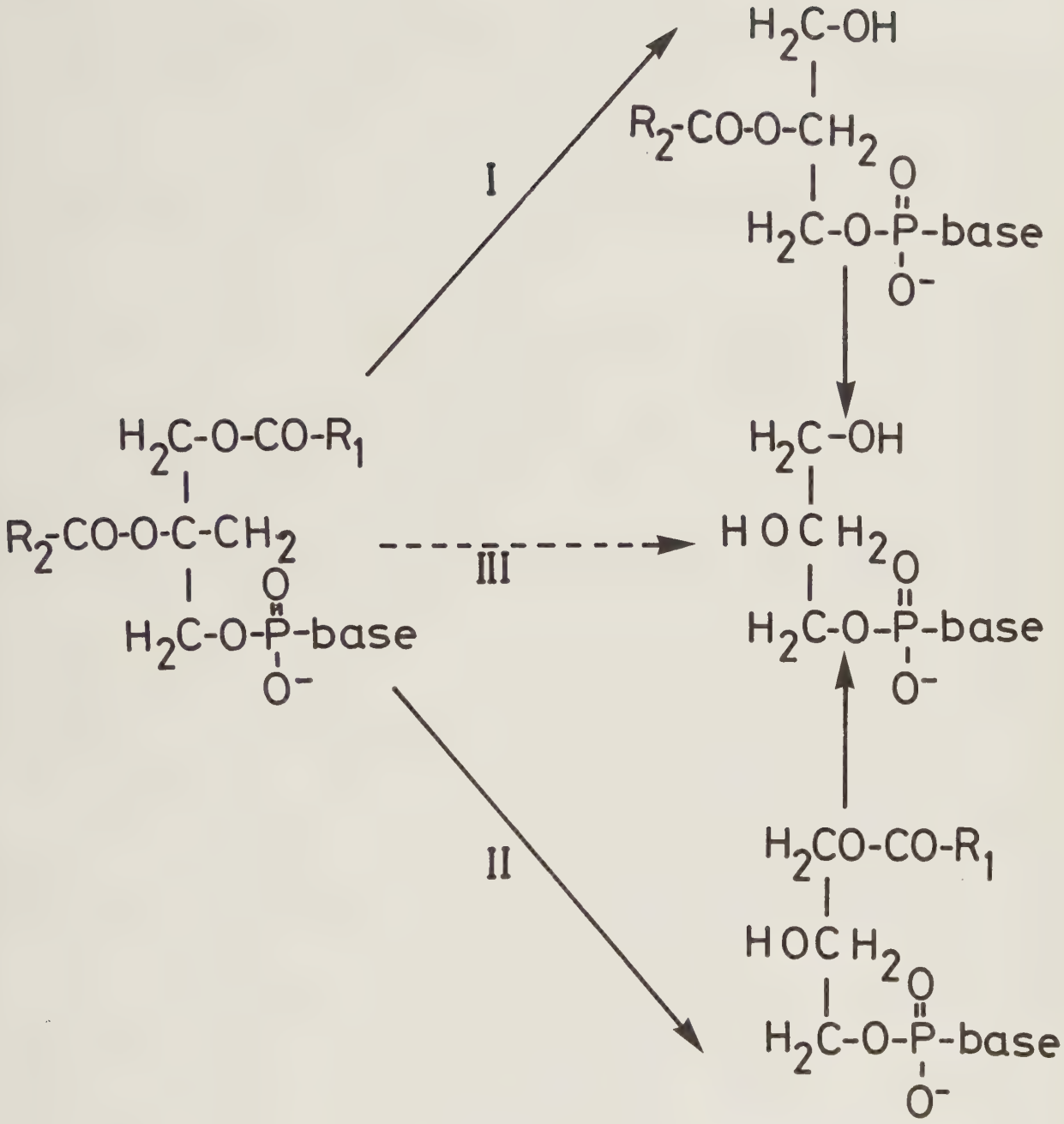
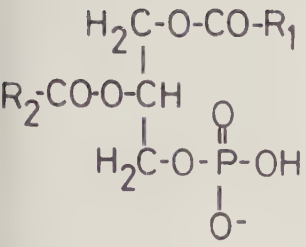
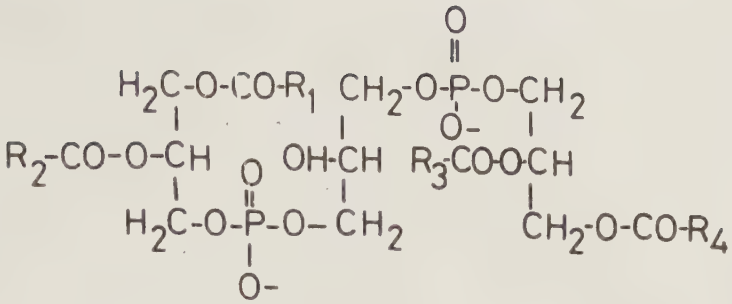


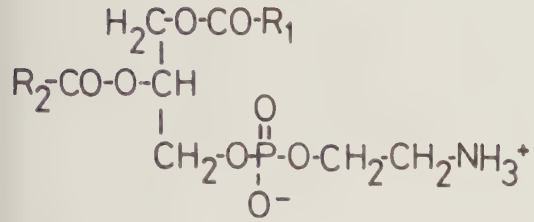
FIGURE 5 : SCHEMA DES REACTIONS CATALYSEES PAR LES PHOSPHOLIPASES A



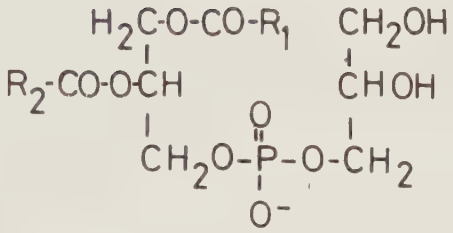
ACIDE PHOSPHATIDIQUE



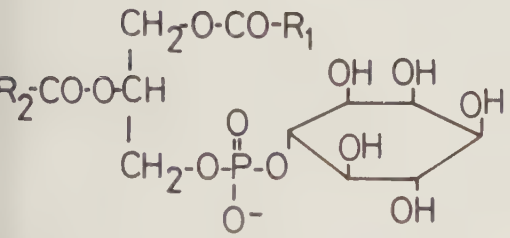
CARDIOLIPIDE



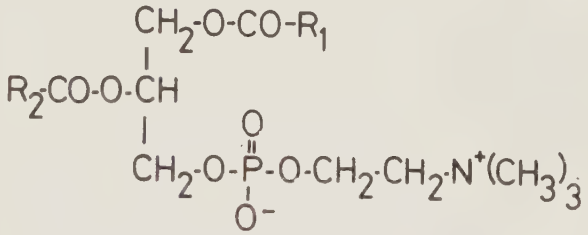
PHOSPHATIDYL ETHANOLAMINE



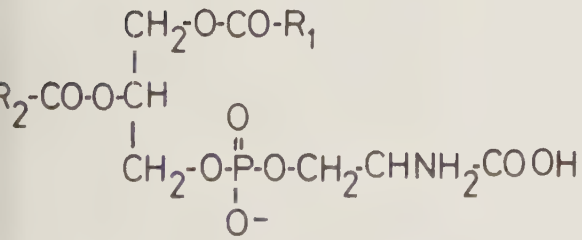
PHOSPHATIDYL GLYCEROL



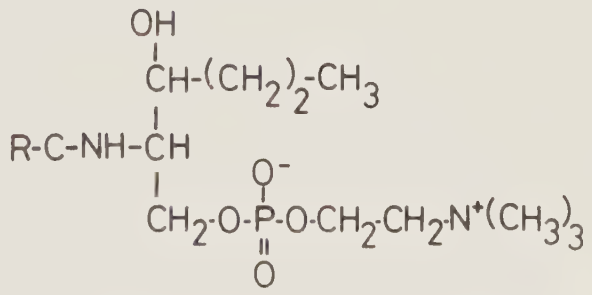
PHOSPHATIDYL INOSITOL



PHOSPHATIDYL CHOLINE



PHOSPHATIDYL SERINE



SPHYNGOMYELINE

était faible. Au même moment (44-45), une activité semblable fut mise en évidence dans les microsomes. Etant donné que les préparations de mitochondries ne sont jamais rigoureusement dépourvues de membranes contaminantes provenant d'autres organelles subcellulaires (cf. chapître I), il était nécessaire d'étudier dans un premier temps les activités phospholipasiques éventuellement présentes dans ces organelles (lysosomes, microsomes et membranes plasmiques) afin de pouvoir les distinguer de l'activité présente dans les préparations mitochondriales.

Deux difficultés se présentent dans l'étude des phospholipases A du foie de rat : d'une part les substrats sont insolubles dans l'eau et d'autre part ces enzymes peuvent agir sur les membranes protéolipidiques sur lesquelles elles sont fixées.

A. Cas des phospholipases solubles ou solubilisées

Le substrat se présente sous la forme de particules plurimoléculaires séparées de l'eau par une interface, au lieu de se disperser comme les substrats solubles au sein d'une phase homogène. Une première hypothèse pourrait consister à supposer que la solubilité d'un substrat réputé insoluble n'est jamais nulle et que la réaction se déroule malgré tout entièrement dans l'eau. Il semble que ce soit le cas pour la phospholipase A de venin d'abeille agissant sur une dihexanoyl-lécithine : l'activité n'augmente plus si la concentration en substrat s'élève au-dessus de la valeur 11 mM (97) valeur critique à partir de laquelle les micelles se forment (125). Ceci tendrait à prouver que la vitesse d'attaque de l'enzyme sur les micelles est négligeable, dans ce cas bien particulier, par rapport à celle de l'attaque sur le substrat en solution. Toutefois certaines enzymes, comme la lipase (126) et la phospholipase (127) pancréatiques, agissent au contraire de façon préférentielle sur des substrats émulsifiés. D'autre part, des phospholipases A de venin de serpent modifient par leur action les propriétés de films phospholipidiques ce qui montre qu'elles sont bien capables d'agir au niveau d'une interface lipide-eau.

Le problème qui se pose donc est de réaliser des émulsions de phospholipides homogènes et de façon reproductible. Si cela est possible avec des glycérides (126, 128), avec des phospholipides il en va autrement en raison principalement de la taille des micelles obtenues (250 Å de diamètre environ (129)) ce qui exclut l'utilisation de compteurs de particules type COULTER en vue de contrôler l'homogénéité de l'émulsion. D'autre part au cours de la sonication, les phospholipides se dégradent (129) en lysodérivés, produits qui modifient les caractéristiques physiques des micelles. L'importance de cette dégradation est difficile à contrôler compte tenu du très grand nombre de paramètres qui interviennent au cours de la sonication (129). Si, avec une émulsion donnée, nous avons pu constater que les phospholipases obéissaient aux règles classiques de l'enzymologie, les remarques faites ci-dessus expliquent les variations que nous avons observées dans les valeurs de K_M ou de vitesse maximale. Ces difficultés peuvent théoriquement être levées en utilisant les remarques faites par BENZONANA et DESNUELLE (126) :

- la vitesse initiale de la réaction est déterminée par le nombre de molécules d'enzyme adsorbées à l'interface

- en conséquence, pour un substrat insoluble, la notion de concentration pondérale ou molaire doit être remplacée par celle de concentration d'interface c'est-à-dire par l'aire de l'interface par unité de volume de l'émulsion. Les représentations de Lineweaver -Burke deviendraient alors indépendantes de la finesse et du volume de l'émulsion.

Ces hypothèses partiellement vérifiées dans le cas de la lipase pancréatique, devraient pouvoir s'appliquer au cas de la phospholipase. Récemment, Dervichian (130) a proposé de relier l'activité phospholipasique non pas à des variations de quantités de substrat, mais à des variations de paramètres physiques tels que la surface d'un film à tension superficielle constante : l'activité phospholipasique exprimée en fonction de ce paramètre permet alors d'obtenir des droites reproductibles dans le système de représentation de Lineweaver-Burke.

Cas des phospholipases attachées aux membranes biologiques

Comme pour toute enzyme, la fixation des phospholipases sur des membranes peut modifier profondément leurs caractéristiques d'action. D'autre part les phospholipases peuvent agir sur les phospholipides constitutifs de ces membranes. Or, mis à part leurs quantités respectives, on ne sait rien de l'arrangement de ces phospholipides les uns par rapport aux autres, ni de leurs interactions avec les protéines membranaires , ni de leurs mouvements éventuels, etc,... . Parler de K_M a propos des phospholipases agissant sur des phospholipides endogènes est peu justifié.

Compte tenu de ces difficultés théoriques, les principales caractéristiques des phospholipases A du foie de rat étudiées ici ont été la spécificité, l'influence des ions et le pH optimum, caractéristiques qui a priori ne doivent être que peu influencées par l'état physique du substrat. Des paramètres cinétiques ont cependant été mesurés (K_M et $V_{max.}$). Si leurs valeurs absolues sont sujettes à caution, leurs valeurs relatives pour différentes phospholipases A permettent des comparaisons intéréssantes.

II. MESURE DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE

Essentiellement deux modes opératoires ont été mis au point : le premier utilise des substrats radioactifs marqués par du (^{32}P)-phosphate ; le second est basé sur la mesure qualitative et quantitative des acides gras libérés.

A. Utilisation de substrat radioactif((^{32}P)-PE)

La (^{32}P)-phosphatidyl-éthanolamine (PE) préparée comme décrit au chapitre I est émulsionnée par action des ultrasons dans de l'eau en présence d'éther éthylique : 1 ml de (^{32}P)-PE environ 12 mM est évaporé à sec sous azote afin d'éliminer toute trace de chloroforme. Au résidu sont ajoutés 5 ml d'eau et 0,3 ml d'éther éthylique. La (^{32}P)-PE est alors mise en suspension à l'aide d'ultrasons

(Branson sonifier, 10 A, 2 fois 30 secondes) le tube contenant la suspension étant plongé dans de la glace. La quantité de (^{32}P)-PE ainsi émulsionnée est comprise entre 200 et 800 nmoles/ml.

Le milieu d'incubation est composé de : 100 à 500 nmoles de (^{32}P)-PE, tampon 20 mM (acétate jusqu'à pH 5,5, Tris maléate entre pH 5,5 et 8,9, glycine-NaOH au-dessus de pH 9 ; le tampon Tris-HCl a parfois été utilisé entre pH 7,5 et 9), et éventuellement de KCl 0,15 M et de $CaCl_2$ 2 mM. Le volume final est de 1 ml et la quantité de protéines comprise entre 0,05 et 1,5 mg. Après 15 ou 20 minutes d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par 4 ml du mélange chloroforme-méthanol (2:1 v/v). Après agitation et centrifugation, la phase inférieure est récupérée. La phase supérieure est acidifiée par 5 gouttes d'acide chlorhydrique 1 N et traitée 2 fois par 3 ml de la phase inférieure du mélange chloroforme-méthanol-eau (100:50:55 v/v). Les différentes phases organiques sont rassemblées, évaporées à sec sous azote et reprises dans 0,2 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (2:1 v/v). 60 ou 90 µl de cette solution sont analysés par chromatographie sur couche mince. Après autoradiographie (Figure 6) ou révélation par pulvérisation de ninhydrine, la silice supportant les spots radioactifs de PE et de lyso-PE est grattée et déposée dans des flacons de comptage de radioactivité par scintillation. Il est alors possible d'obtenir directement le pourcentage de (^{32}P)-PE hydrolysée.

B. Mesure des acides gras libérés

Cette mesure peut s'effectuer après incubation en présence de (^{32}P)-PE ou de PE de jaune d'oeuf, ou en absence de tout substrat exogène (mesure de l'hydrolyse des phospholipides endogènes) : les conditions d'incubation sont les mêmes que précédemment, toutes les quantités étant cependant doublées.

Deux méthodes ont été utilisées pour l'extraction des acides gras :

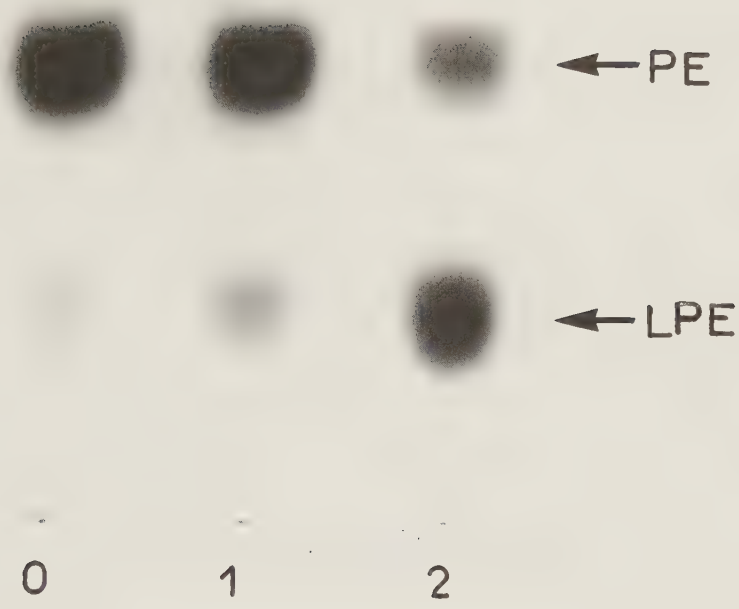


FIGURE 6 : AUTORADIOGRAPHIE D'UNE SEPARATION DE (^{32}P) PE ET DE (^{32}P) LYSO PE SUR COUCHE MINCE DE SILICA GEL G, APRES INCUBATION EN PRESENCE DE TRITOSOMES

0) - Temps zéro ; 1) - 20 minutes d'incubation à pH 8,5 ;
2) - 20 minutes d'incubation à pH 4,5

1) - Mesure des seuls acides gras

La réaction est arrêtée par 10 ml du mélange alcool isopropylique/heptane/acide sulfurique (80:20:2 v/v) (131). Après agitation, deux phases se forment après addition de 4 ml d'eau et de 6 ml d'heptane. La phase supérieure est récupérée, puis évaporée à sec sous azote. Après méthylation par le diazométhane, puis évaporation à sec sous azote, les esters méthyliques d'acide gras sont repris dans 0,05 ml d'hexane. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse se fait sur 0,004 ml de cette solution.

2) - Mesure simultanée des acides gras libérés et des phospholipides hydrolysés

Dans certains cas, et en particulier dans celui des mitochondries de levure, il est intéréssant de mesurer les phospholipides endogènes restant en fin d'incubation. L'arrêt de la réaction et les extractions se font comme décrit au paragraphe I A. Après concentration, les acides gras et une partie des lipides neutres sont séparés des phospholipides par chromatographie sur colonne d'acide silicique-célite 545 (1 g et 0,5 g). Les acides gras sont élués par 15 ml de chloroforme, puis les phospholipides par 20 ml de méthanol. Les acides gras sont ensuite traités comme précédemment pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. Il est à noter que dans ce cas les lipides neutres ne semblent pas interférer. Après séparation des phospholipides par chromatographie sur couche mince et révélation des spots par des vapeurs d'iode, les phospholipides sont élués de la silice par 10 ml du mélange chloroforme-méthanol (2:1 v/v) et la quantité de phosphate dosée selon BARTLETT (67).

III. ACTIVITES PHOSPHOLIPASIQUES DANS LES ORGANELLES SUBCELLULAIRES

A. Cas des lysosomes

Les premiers essais effectués ayant montré qu'il existait dans le foie de rat une importante activité enzymatique se traduisant par une libération d'acides gras dans un domaine de pH acides, ce fait suggérait

la présence de phospholipase (s) lysosomiale (s), phospholipase (s) étudiée (s) par la suite par plusieurs auteurs (37-40).

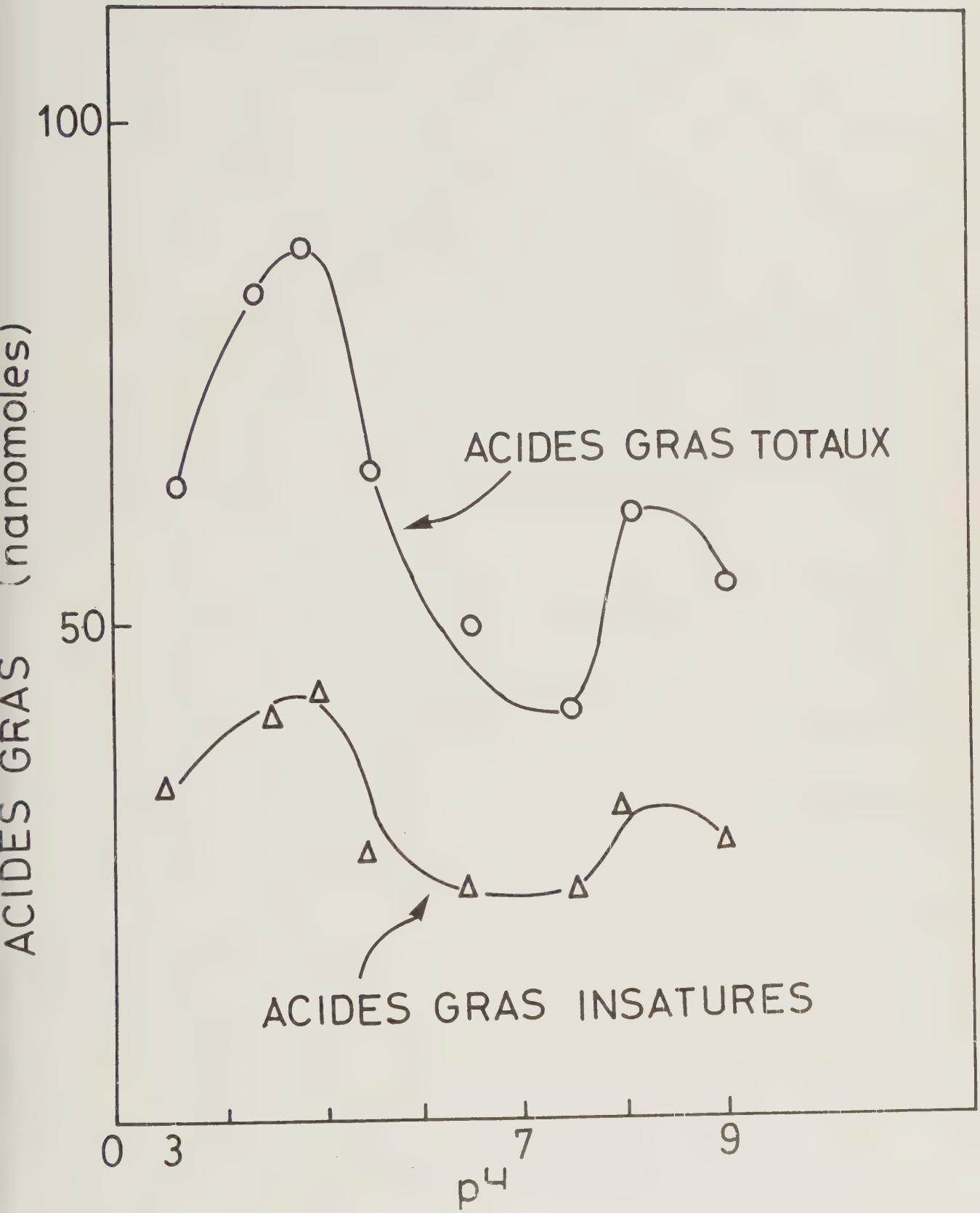
Des préparations différentes ont été essayées : la fraction H (tritosomes, c'est-à-dire lysosomes ayant absorbé in vivo du Triton WR 1339), la fraction L (fraction obtenue par centrifugation différentielle du surnageant post-mitochondrial et sédimentant à 150 000 g x min, soit avant les microsomes), la fraction S (surnageant obtenu après sédimentation des mitochondries purifiées par action de faibles quantités de digitonine) et une fraction enrichie en membranes de lysosomes (obtenue à partir de tritosomes soit par dialyse contre une solution de $NaHCO_3$ 1 mM, EDTA 1 mM à pH 7,5 pendant une nuit et centrifugation à 100 000 g pendant 20 minutes, soit par traitement à l'aide d'un tampon phosphate hypotonique et passage à travers un gradient de saccharose).

Une première expérience a consité à mesurer en fonction du pH l'activité phospholipasique dans une préparation de membranes de lysosomes (Figure 7). Le rapport des activités observées à pH 4,5 et 8 est d'environ 2. Cette valeur assez faible s'explique à postériori par l'effet inhibiteur du calcium sur l'activité phospholipasique acide et par le caractère essentiellement soluble des phospholipases acides lysosomiales (voire plus loin).

A pH acide, les acides gras saturés représentent environ la moitié des acides gras libérés, indiquant la présence possible soit de deux phospholipases (de types A_1 et A_2) soit d'une phospholipase et d'une lysophospholipase. Bien que l'existence d'une activité lysophospholipasique acide lysosomiale ait été mise en évidence (40), dans nos conditions expérimentales cette activité est négligeable puisque la somme des quantités de PE et de lyso-PE trouvées en fin d'incubation est égale à la quantité de PE initiale, les variations observées étant au maximum de 10 %, et que d'autre part la quantité de lyso-PE augmente linéairement en fonction du temps. Ceci permet de conclure à l'existence de deux phospholipases acides lysosomiales de type A_1 et A_2.

FIGURE 7 : EFFET DU pH SUR L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES MEMBRANES DE LYSOSOMES

Les membranes de lysosomes sont obtenues après rupture par cho osmotique de Tritosomes et purifiées par passage sur un gradie discontinu de saccharose. Conditions d'incubation : 0,4 mg de d'oeuf, tampons 50 mM (acétate jusqu'à pH 5,5, Tris-maléate entre pH 5,5 et 8, triéthanolamine au-dessus de pH 8), 0,27 mg de protéines, $CaCl_2$ 2 mM, volume final 1 ml, 1 heure à 37°C.


100
50
ACIDES GRAS (nanomoles)
ACIDES GRAS TOTAUX
ACIDES GRAS INSATURES
0
3
7
9
pH

L'origine et le type de l'activité phospholipasique alcaline présente dans cette fraction ne peuvent être définis. En effet, si le passage à travers un gradient de densité a permis d'obtenir un accroissement de l'activité phosphatasique acide de référence, on constate également une augmentation de l'activité spécifique des enzymes de référence d'organelles subcellulaires autres que les lysosomes. Pour résoudre ce problème, trois fractions possédant une forte activité phosphatasique acide et par conséquent enrichies en lysosomes ont été testées (Tableau 7). Dans ces fractions on constate que les activités phosphatasique et phospholipasique acides varient de pair et qu'il existe également une activité phospholipasique alcaline, beaucoup plus faible cependant. En tenant compte des contaminations (évaluées à l'aide des valeurs des activités des enzymes de référence) on peut calculer que la valeur du rapport de l'activité phospholipasique acide à celle de l'activité observée à pH alcalin est de l'ordre de 10 sauf pour la fraction L qui est très hétérogène. Ceci indique qu'une phospholipase alcaline ne peut être présente qu'en très faible quantité dans les lysosomes.

Si l'on étudie la répartition des activités phospholipasiques acide et alcaline à l'intérieur des lysosomes on aboutit à une conclusion semblable. En effet, après dialyse de la fraction H (tritosomes) pendant 12 heures contre une solution très hypotonique, et centrifugation (voire p. 39) on obtient deux fractions : l'une contient les enzymes lysosomiales solubles et l'autre les membranes de lysosomes. Le Tableau 8 indique la répartition des activités enzymatiques de référence et celles des phospholipases A entre ces diverses fractions. Trois constatations peuvent être faites :

1 - la phosphatase acide se répartit également entre membranes et fraction soluble, résultat en accord avec ceux de SAWANT (78).

2 - l'activité de la 5'-AMPase est très élevée et les deux fractions solubles et particulaires ont la même activité totale. Compte tenu de la valeur de l'activité spécifique de cette enzyme, les membranes plasmiques représenteraient environ 50 % des protéines des deux fractions, ce qui semble peu probable. Cette activité due en réalité

T A B L E A U VII

Activités phospholipasiques A de diverses fractions "riches en phosphatase acide" et activités spécifiques des enzymes de référence.

	Phospholipase A		Enzymes de référence				
	pH 4,5	pH 8,5	Cyt. c oxydase	M.A.O.	Phosphatase acide	NADPH cyt.c réductase	5'-AMPase
	nmoles (^{32}P) lyso PE par mg de protéines		µmoles de produit formé /min./mg de protéines				
Fraction H	806	9	ND*	0,5	845	6,3	433
Fraction L	39	24	206	ND*	220	30	100
Fraction S	48	6	39	ND*	450	19	190

* non détecté

Isolement des fractions solubles et membranaires de tritosomes et distribution des activités phospholipasiques acides et alcalines.

La phospholipase A acide est mesurée à pH 4,5, la phospholipase A alcaline à pH 8,5. Incubation 15 minutes à 37°C en présence de (^{32}P)-PE 300 µM et de 50 µg de protéines.

Activités spécifiques exprimées en nmoles x min.$^{-1}$ x mg^{-1}.

	Protéines	Phosphatase acide		5'AMPase		NADPH cyt. c		Phospholipase acide		Phospholipase alcaline	
	mg	Act. Spec.	% Act. Tot.	Act. Spec.	% Act. Tot.	Act. Spec.	% Act. Tot.	Act. Spec.	% Act. Tot.	Act. Spec.	% Act. Tot.
Tritosomes	14,8	1039		563		3,7		55		6,4	
Soluble	6,8	678	30	341	28	5,1	63	80	67	0,8	5,7
Membranes après dialyse des tritosomes	2	1932	25	1312	32	7	26	23	6	5,2	11

à la 5'AMPase lysosomiale encore active à pH 7,5 (cf. p.23) semble donc être partiellement soluble (50 % environ) à moins que le processus de dialyse ne soit responsable de cette solubilisation. Il est à noter que ce même processus de dialyse ne solubilise pas la 5'AMPase des membranes plasmiques.

3 - les activités phospholipasiques acides sont entièrement solubles.

4 - l'activité phospholipasique alcaline est 10 fois plus faible que la précédente et semble être attachée aux membranes. Cette activité est de type A_2 prédominant (tableau 9).

Les deux activités phospholipasiques décelées dans les préparations lysosomiales diffèrent par leurs réponses à la présence d'ions dans le milieu d'incubation (Tableau 10) : le calcium et le potassium inhibent les activités phospholipasiques acides et augmentent l'activité observée à pH 8. Etant donné l'hétérogénéité des fractions testées il est difficile de donner une explication de ces différences puisque de nombreux paramètres sont en jeu. Cependant un rapprochement peut être fait entre l'activité phospholipasique et le potentiel de surface des micelles de phospholipides. Les micelles de phospholipides étant formées de couches mono ou plurimoléculaires, les résultats obtenus par l'étude des couches artificielles mono ou bimoléculaires peuvent être en première approximation appliqués aux micelles.

Divers auteurs (132,133) ont montré qu'un accroissement de pH ou de la concentration en électrolytes (Ca^{++}, Al^{+++}, UO_2^{+}) entraînait une expansion d'un film monomoléculaire de PE, l'inverse étant également vrai. Ces variations de la surface occupée par une molécule de PE peuvent être l'un des facteurs intervenant dans l'activité phospholipasique, puisqu'une augmentation de cette surface implique qu'il y a moins d'empêchements, dûs à l'encombrement stérique, pour chaque molécule d'accéder au site actif de l'enzyme. Comme l'a souligné DAWSON (134) cette expansion peut aussi être créée par de l'éther éthylique. D'autre part, un accroissement de pH entraîne une diminution

T A B L E A U IX

Nature des acides gras relâches par action des phospholipases du foie de rat sur la (^{32}P)-PE.

0,1 à 0,4 mg de protéines ont été utilisés, la concentration en substrat étant 215µM en présence de $CaCl_2$ 2 mM et de KCl 0,1 M. Volume final 2 ml. 30 minutes à 37°C

Fractions	pH	% acides gras saturés	% acide arachidonique	rapport $\frac{\text{unsaturés}}{\text{saturés}}$
ochondries (M_D)	9	24,9	40	3,0
branes internes	9	24,6	41	3,1
branes externes	9	27	35	2,7
branes lysosomiales	9	33,2	42	2
rosomes	8,3	69	15	0,4
branes plasmiques	9	85,9	ND*	0,2
in de serpent	8,3	3,1	55	28,4
H		45,6	21	1,2

* non détecté

T A B L E A U X

Effets du chlorure de potassium et du chlorure de calcium sur les activités phospholipasiques de fractions subcellulaires de foie de rat.

Conditions d'incubation : 150 à 220 nmoles de (^{32}P)-PE, 0,1 mg de protéines, $CaCl_2$ 2 mM, KCl 0,1 M, durée 20 minutes, volume 1 ml.

Fractions	pH	ADDITIONS -	$CaCl_2$	KCl	$CaCl_2$+KCl
		nmoles de (^{32}P)-lyso PE formées/mg de protéines			
chondries	4,5	28	26	19	9
	9	ND*	8	18	23
osomes	8,2	13	23	54	49
ranes plasmiques	9	ND*	41	38	65
tion S	4,5	148	73	54	30
	8,2	6	6	9	9

* non détecté

du potentiel superficiel de couches monomoléculaires, une augmentation de la concentration en électrolytes ayant l'effet inverse. Une relation avec l'activité phospholipasique est ainsi suggérée : à bas pH, le potentiel superficiel étant élevé, les ions calcium ne sont pas nécessaires, tandis qu'à pH alcalin ils annulent l'effet du pH. Une relation du même ordre a été suggérée par DAWSON (135) qui a comparé l'activité phospholipasique à la migration électrophorétique des phospholipides dans diverses conditions.

Il est à noter au passage que le potentiel superficiel des couches monomoléculaires de phospholipides dépend des caractéristiques des groupes polaires des molécules. On peut prévoir ainsi que la PC, moins chargée électriquement que la PE, devrait être moins bien attaquée par la phospholipase A, ce qui se vérifie dans de très nombreux cas.

Enfin, les ions monovalents, tels que le potassium, sont capables de s'échanger avec les ions calcium fixés sur une couche monomoléculaire de PE (136). Ceci est à comparer d'une part avec le peu d'effet du calcium en présence de potassium sur l'activité phospholipasique alcaline et d'autre part, à l'effet activateur du potassium sur cette même phospholipase puisque cet ion peut, à des concentrations élevées, simuler l'effet du calcium.

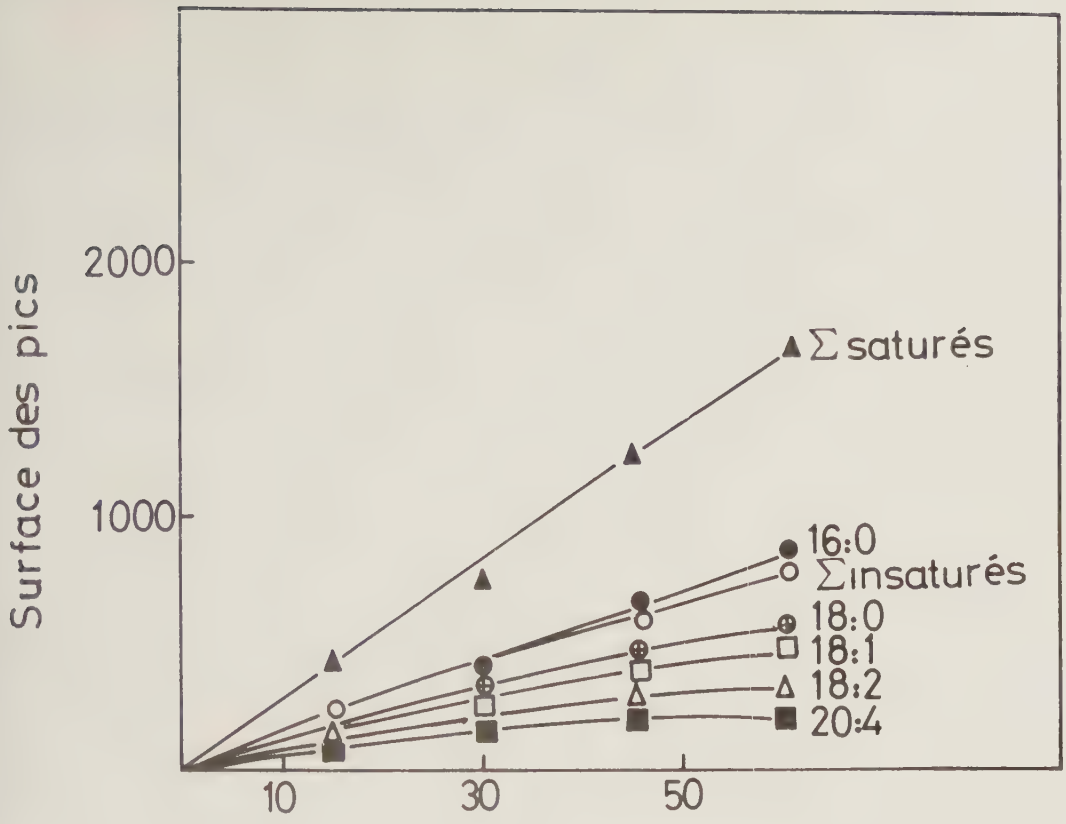
L'effet inhibiteur du calcium sur la phospholipase acide lysosomiale n'affecte que l'activité totale et ne modifie pas le type d'acides gras libérés (Figure 8).

Compte tenu de l'effet des ions, la courbe d'activité en fonction du pH (Figure 9 A) confirme que, les deux activités étant mesurées dans les conditions optimales, celle observée à pH alcalin est mineure par rapport à celle mesurée à pH acide.

Enfin les activités phospholipasiques acides et alcaline des fractions solubles et membranaires lysosomiales diffèrent par leur K_M apparent : environ 120 μ M dans le cas de la phospholipase A_2

FIGURE 8 : CINETIQUE DE RELACHEMENT DES ACIDES GRAS A pH 4,5 PAR DES TRITOSOMES

Courbes supérieures en présence de $CaCl_2$ 2 mM, courbes inférieures en absence de $CaCl_2$
Conditions d'incubation : les tritosomes (0,16 mg de protéi sont incubés à pH 4,5 (tampon acétate 50 mM) et à 37°C en présence de 0,4 mg de PE d'oeuf émulsionnée par ultrasons. Volume final 1 ml.


Surface des pics
2000
1000
Σ saturés
16:0
Σ insaturés
18:0
18:1
18:2
20:4
10
30
50

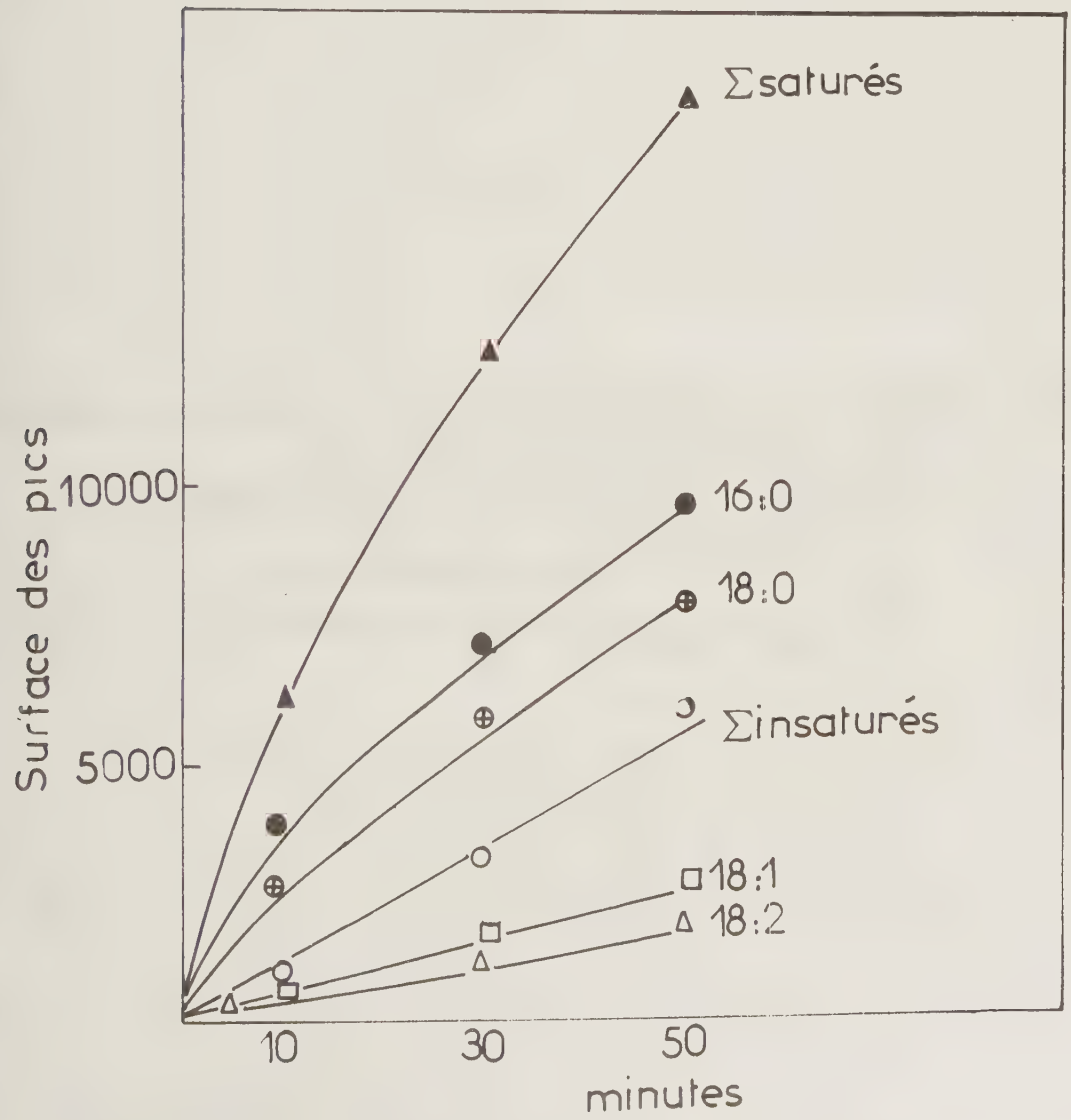

Surface des pics
10000
5000
Σ saturés
16:0
18:0
Σ insaturés
18:1
18:2
10
30
50
minutes

FIGURE 9 : ACTIVITES PHOSPHOLIPASIQUES DANS DES PREPARATIONS DE LYSOSOMES

A - Activité en fonction du pH (Tritosomes)

B - Effet de la concentration en substrat (membranes de tritosomes à pH 9)
Km = 120 µM, V_{max} = 5,5 nmoles/min./mg prot.

C - Effet de la concentration en protéines (fraction soluble de tritosomes à pH 4,5)

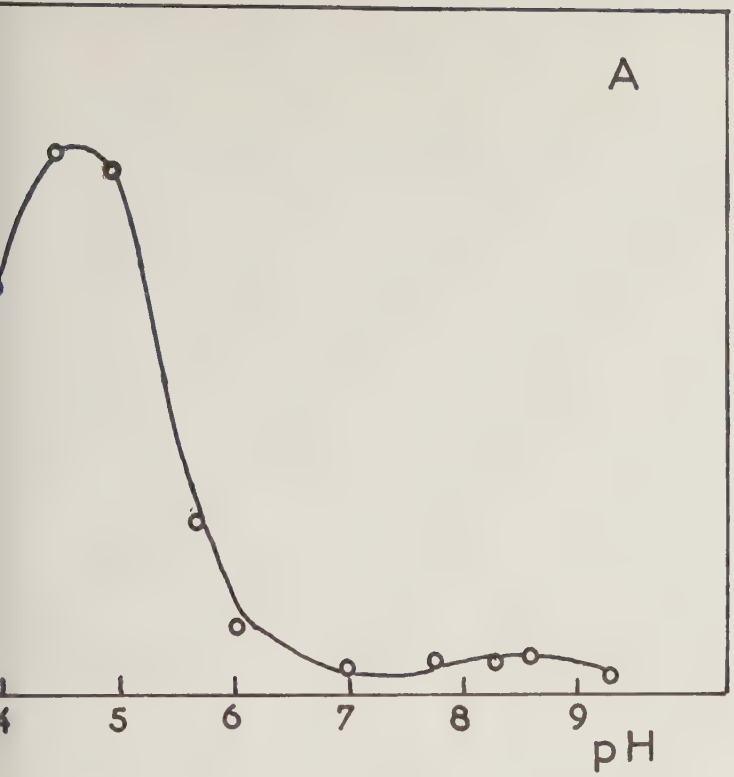
Conditions d'incubation :

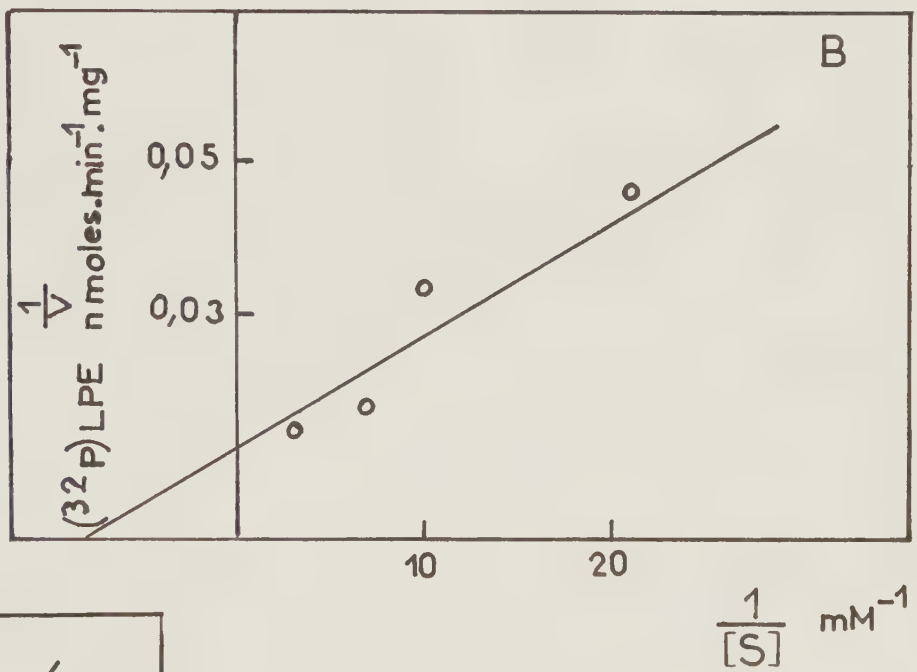
A - 0,32 mg de protéines, 160 nmoles de (^{32}P) PE

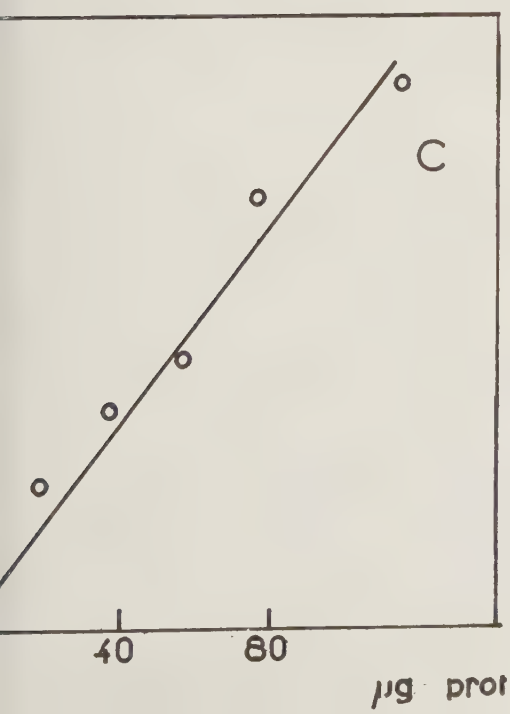
B - 0,05 mg de protéines, 15 minutes à 37°C

C - 200 nmoles de (^{32}P) PE, 15 minutes à 37°C

Volume final 1 ml. $CaCl_2$ 2 mM et KCl 0,1 M au-dessus de pH 6 seulement


A
5
6
7
8
9
pH


B
$\frac{1}{V}$ (32 P) LPE n moles.min^{-1}.mg^{-1}
0,05
0,03
10
20
$\frac{1}{[S]}$ mM^{-1}


C
40
80
µg prot.

alcaline membranaire (Figure 9 B) et plus de 600 µM dans le cas des phospholipases acides solubles. Pour ces dernières, ces caractéristiques ont été mesurées en utilisant la libération d'acides gras saturés pour évaluer l'activité phospholipasique A_1 et la libération d'acides gras unsaturés pour l'activité A_2. Ces deux mesures étant faites à partir d'un même tube d'incubation, les différences observées entre les K_M et les V_{max} sont indépendantes de la qualité de l'émulsion de PE utilisée. La vitesse maximale d'action de la phospholipase A_1 (40 nmoles/min./mg) est environ deux fois plus forte que celle de la phospholipase A_2. Ceci permet de rendre compte de l'important relâchement d'acides gras saturés observé dans la figure 8 comparativement à la libération d'acides gras unsaturés.

B. Cas des microsomes

L'activité phospholipasique mesurée dans les préparations de microsomes ou de réticulum rugueux ne présente qu'un optimum à pH alcalin (environ 8,5) (Figure 10 A). L'absence d'activité phospholipasique à pH acide s'explique par la faible quantité de lysosomes dans les préparations, ainsi que l'indique l'activité de la phosphatase acide (25 à 30 nmoles de p-nitro phenyl-phosphate hydrolysées/min/mg de protéine). La valeur du pH optimum trouvée est légèrement plus faible que celle obtenue par d'autres auteurs (45) ce qui est essentiellement dû à des conditions de test non identiques.

Les valeurs de K_M oscillent entre 100 et 400 µM, la figure 10 B montrant que la phospholipase microsomiale obéit bien aux règles classiques de cinétique enzymatique, lorsqu'elle agit sur une émulsion de PE.

La phospholipase microsomiale est activée par les ions calcium et potassium (Tableau 10). Il est à noter cependant que la stimulation produite par le calcium est plus faible qu'avec les autres phospholipases alcalines du foie de rat. La mesure des acides gras libérés en présence de (^{32}P)-PE indique qu'il s'agit essentiellement d'une phospholipase de type A_1 (tableau 9) (69 % des acides gras libérés sont unsaturés) et que les phospholipides membranaires sont peu attaqués (en présence de PE exogène, environ 10 % des acides gras libérés proviennent des

FIGURE 10 : ACTIVITES PHOSPHOLIPASIQUES DANS LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE RUGUEUX

A - Activité en fonction du pH

B - Effet de la concentration en substrat. Km = 390 µM, V_{max} = 22 nmoles/min./mg de protéines

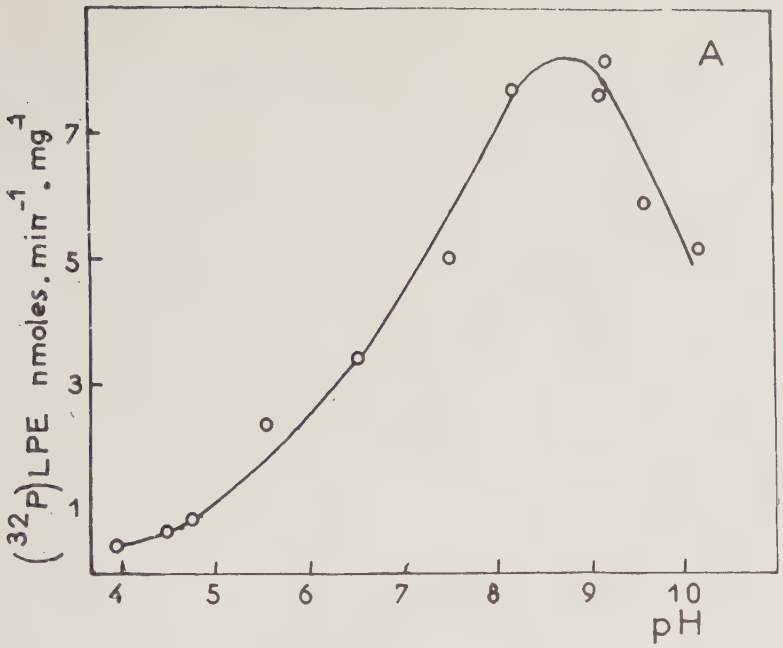
C - Effet de la concentration en protéines

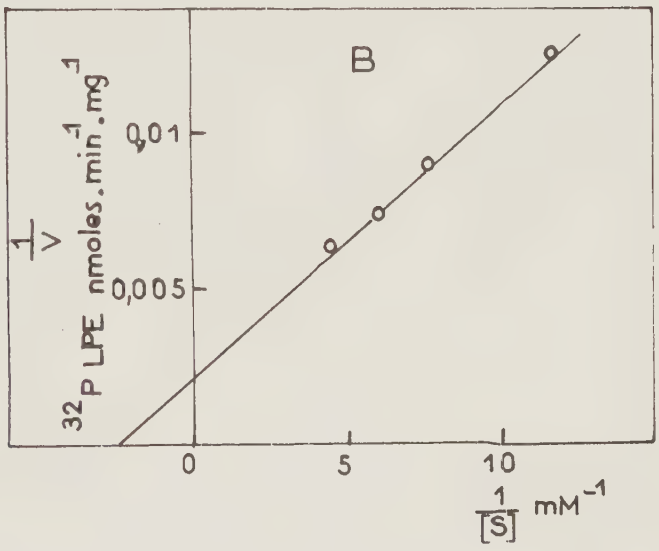
Conditions d'incubation :

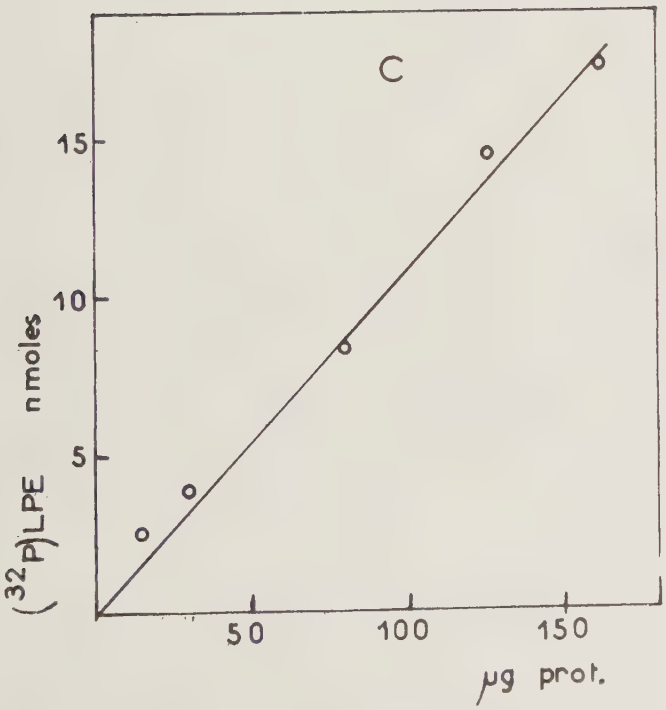
A et B - 0,077 mg de protéines et 215 nmoles de (^{32}P) PE.

C - 150 nmoles de (^{32}P) PE à pH 8,2

Volume final 1 ml, $CaCl_2$ 2 mM et KCl 0,1 M au-dessus de pH seulement, 15 minutes à 37°C.


A
(^{32}P)LPE nmoles.min^{-1}.mg^{-1}
1
3
5
7
4
5
6
7
8
9
10
pH


B
$\frac{1}{V}$ ^{32}P LPE nmoles.min^{-1}.mg^{-1}
0,01
0,005
0
5
10
$\frac{1}{[S]}$ mM^{-1}


C
(^{32}P)LPE nmoles
5
10
15
50
100
150
µg prot.

phospholipides endogènes).

Le fait que la phospholipase microsomiale agisse peu sur les phospholipides membranaires semble indiquer que cette enzyme n'est pas étroitement imbriquée au sein des membranes du réticumum endoplasmique. Il s'avère en effet qu'elle est assez facilement solubilisable par action de KCl 0,3 M . Dans ces conditions, la purification de cette enzyme peut être envisagée et est l'objet de travaux actuellement en cours.

C. Cas des membranes plasmiques

Très récemment, trois groupes de chercheurs ont mis en évidence des activités phospholipasiques situées au niveau des membranes plasmiques (41-44). Bien que de pH optimum un peu supérieur (Figure 11 A), cette phospholipase ressemble beaucoup à celle des microsomes. En effet elle est de type A_1 puisque 80 % des acides gras libérés sont saturés (Tableau 9), les phospholipides endogènes étant peu hydrolysés et fournissant au maximum 25 % des acides gras libérés.

Comme dans le cas des microsomes, les ions calcium et potassium ont un effet activateur, beaucoup plus prononcé toutefois. Compte tenu de l'importante stimulation due au potassium, cet ion doit non seulement agir sur les micelles de substrat comme cela a été suggéré plus haut, mais aussi doit démasquer cette enzyme en modifiant son environnement par l'augmentation de la force ionique du milieu qu'il provoque.

La possibilité d'une contamination des membranes plasmiques par les microsomes semble exclue puisque, pour des activités phospholipasiques comparables, les enzymes de référence indiquent des contaminations réciproques inférieures à 4 %. L'hypothèse selon laquelle il s'agirait d'iso-enzymes voire même d'une seule enzyme a été avancée (42) mais demande encore de nombreuses vérifications.

FIGURE 11 : ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES MEMBRANES PLASMIQUES

A - en fonction du pH (0,15 mg de protéines)

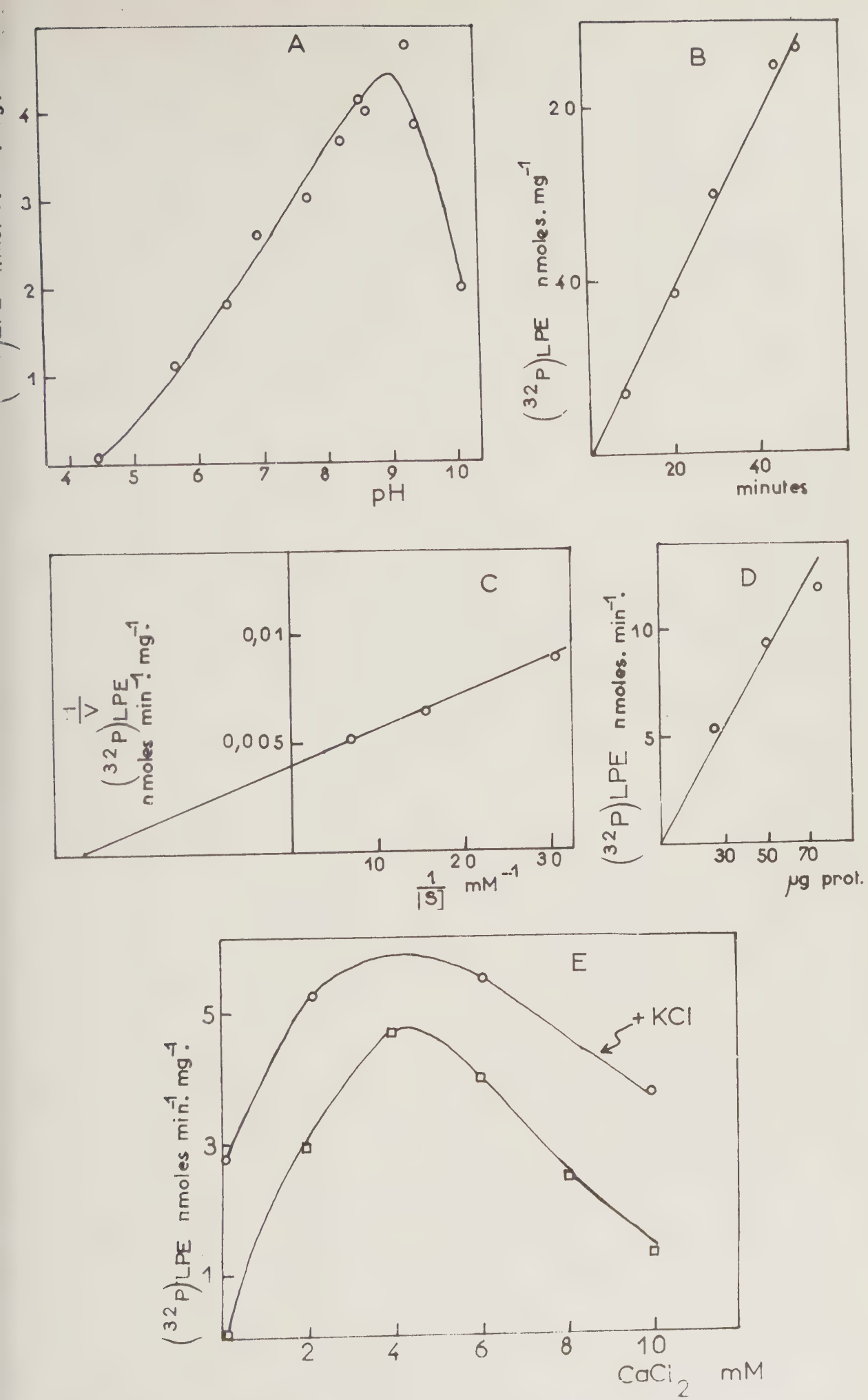
B - en fonction du temps (0,20 mg prot.)

C - en fonction de la concentration en substrat (0,10 mg pr
Km = 40µM V_{max} = 24 nmoles/min./mg prot.

D - en fonction de la concentration en $CaCl_2$

Conditions d'incubation :

pH 9, 150 nmoles de (^{32}P) PE, $CaCl_2$ 2 mM et KCl 0,15 M au-c
de pH 6 seulement, volume final 1 ml, 15 minutes à 37°C.


A
pH
B
(^{32}P)LPE nmoles.mg^{-1}
minutes
C
$\frac{1}{V}$ (^{32}P)LPE nmoles min^{-1}. mg^{-1}.
$\frac{1}{[S]}$ mM^{-1}
D
(^{32}P)LPE nmoles. min^{-1}.
µg prot.
E
+ KCl
(^{32}P)LPE nmoles min^{-1}. mg^{-1}.
$CaCl_2$ mM

L'activité de cette phospholipase se développe linéairement en fonction du temps sur un intervalle de 60 minutes (Figure 11 B). Même au bout de 60 minutes, et bien que la quantité de lyso-PE produite soit importante (20 % de la PE initiale), nous n'avons pas observé d'activité lysophospholipasique. Le K_M apparent est d'environ 40 μM (Figure 11 C) soit le plus faible des phospholipases de foie de rat. Enfin, la concentration optimale en $CaCl_2$ est 2 à 3 mM, en présence ou en absence de KCl 0,15 M. Pour des concentrations égales à 10 mM, il n'y a plus de stimulation (Figure 11 E).

D. CAS DES MITOCHONDRIES

1. Etude sur les mitochondries entières

Les études précédentes ont montré qu'il existait essentiellement deux types d'activité phospholipasique dans les organelles autres que les mitochondries : l'une ayant un pH optimum de 4,5, l'autre de 8-9. Ces deux types d'activité sont présents dans les préparations mitochondriales classiques. Le tableau 10 montre en effet qu'à pH 4,5 il existe une activité inhibée par le potassium et le calcium et qu'à pH 8 l'activité est augmentée par ces ions. L'activité phospholipasique acide peut donc être très probablement attribuée aux lysosomes contaminants. Pour ce qui est de l'activité phospholipasique alcaline qui présente les mêmes caractéristiques vis à vis des ions et du pH que les activités observées dans les membranes de lysosomes, de réticulum endoplasmique et dans les membranes plasmiques, son origine reste incertaine.

La courbe d'activité en fonction du pH (figure 12) apporte de nouvelles indications : l'activité phospholipasique acide est maximale à pH 4,5 ce qui correspond bien à une origine lysosomiale. Par contre l'activité phospholipasique alcaline semble maximale sur une large zone de pH (de 8 à 10) ce qui la différencie des phospholipases des microsomes ou des membranes plasmiques, sans toutefois être un argument définitif.

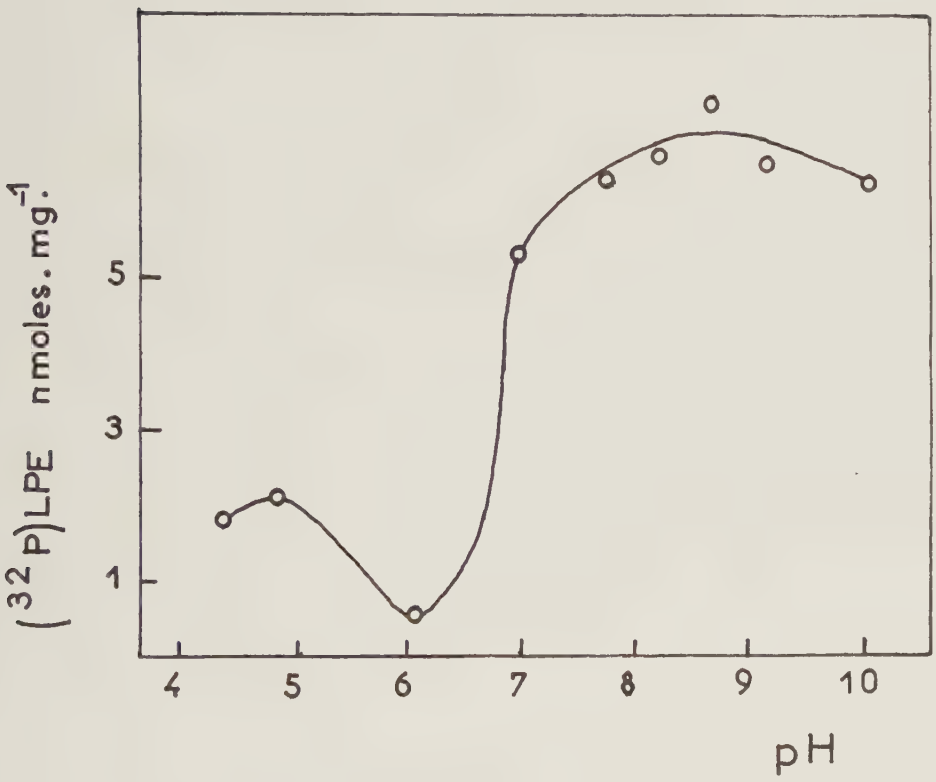


FIGURE 12 : ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE MITOCHONDRIALE EN FONCTION DU pH
Conditions d'incubation : 1 mg de protéines, et 170 nmoles de (^{32}P) PE, $CaCl_2$ 2 mM et KCl 0,1 M au-dessus de pH 6, volume final 1 ml, 15 minutes à 37°C.

L'origine de l'activité observée à pH alcalin ne peut être définitivement précisée qu'en suivant son évolution au cours de la purification des mitochondries. Quelle que soit la méthode de mesure et le substrat employés (respectivement mesure de la quantité d'acides gras libérés et PE de jaune d'oeuf dans un cas, mesure de l'hydrolyse de (^{32}P)-PE de foie de rat dans l'autre cas) on constate que si l'activité phospholipasique alcaline augmente au cours de la purification des mitochondries, (tableau 11) par contre celle de la phospholipase acide diminue. La méthode au Triton WR 1339 ayant pour but principal d'éliminer les lysosomes (cf. p.24) l'origine lysosomiale de l'activité phospholipasique acide se trouve confirmée ainsi que la nature extralysosomiale de l'activité phospholipasique alcaline. D'autre part, le fait qu'au cours du traitement le pourcentage d'acides gras unsaturés libérés croisse, indique que l'on purifie une phospholipase de type A_2 en éliminant les activités contaminantes de type A_1 (celles des microsomes et des membranes plasmiques). Ceci est confirmé d'une part en remarquant la faible activité de la 5'-AMPase trouvée dans la fraction E_T (2 % de l'activité présente dans des membranes plasmiques purifiées) et d'autre part en calculant que la phospholipase des microsomes représente au maximum 20 % de l'activité de la fraction E_T compte tenu de la contamination révélée par l'activité de la NADPH cytochrome c réductase.

La seconde méthode de purification des mitochondries (basée sur l'action de faibles quantités de digitonine) a permis d'obtenir des résultats et des conclusions identiques à ceux qui viennent d'être exposés. Le fait qu'au cours de ce traitement, les activités de la phospholipase alcaline d'une part et, d'autre part, celles de la 5'-AMPase et de la phosphatase acide varient en sens inverse (Tableau 12) indique que cette activité phospholipasique n'est pas due à ces membranes contaminantes. Les activités phospholipasiques et NADPH cytochrome c réductase restent dans le même rapport : les valeurs de l'activité spécifique de la NADPH cytochrome c réductase dans les fractions M et M_d indiquant une contamination par les microsomes de 3 et 4 % respectivement, on peut estimer l'apport de la phospholipase des microsomes à moins de 10 % de l'activité phospholipasique dans ces fractions.

T A B L E A U XI

Effet de la purification des mitochondries (Méthode au Triton WR 1339) sur l'activité phospholipasique mesurée dans deux préparations différentes.

A) - par la libération d'acides gras en présence de 0,4 mg de PE d'oeuf

B) - par l'hydrolyse de (^{32}P)-PE (180 μM).

Conditions d'incubation :

A) - $CaCl_2$ 2 mM, 2,5 mg de protéines, volume final 4 ml

B) - $CaCl_2$ 2 mM, KCl 0,1 M, 1, 25 mg de protéines, volume final 1 ml.

	pH	Acides gras libérés		(^{32}P) lysoPE
		A		B
		Act. Spéc.*	% Insaturés	Act. Spéc.*
ondries brutes	4,5	53	48	42
	8,2	13	64	14
ondries puri- (E_T)	4,5	23	46	24
	8,2	21	72	18

* nmoles/mg de protéines/heure.

T A B L E A U XII

Rapport de l'activité spécifique de la phospholipase A alcaline à celle des enzymes de référence dans des mitochondries brutes et des mitochondries purifiées par la méthode à la digitonine.

L'activité phospholipasique est mesurée à pH 8,5 en présence de 120 nmoles de (^{32}P)-PE, $CaCl_2$ 2 mM, KCl 0,1 M, pendant 30 minutes à 37°C. Volume final 1 ml. 0,4 mg de protéines.

Rapport des act. spéc.	Phospholipase A				
	Cyt. c oxydase	M.A.O.	Phosphatase acide	NADPH cyt.c réductase	5'AMPase
itochondries brutes M)	3,1	7,7	0,24	4,2	0,7
itochondries purifiées M_d)	3,3	4,8	1,20	3,4	7,6

Enfin les valeurs d'activité de la phospholipase et de la monoamine oxydase restent inchangées l'une par rapport à l'autre au cours du traitement ce qui semble indiquer que ces deux enzymes font partie du même ensemble structural dans les mitochondries.

Une caractéristique essentielle de l'activité phospholipasique observée dans les préparations mitochondriales est que, dans les mêmes conditions, la quantité d'acides gras libérés est très supérieure à celle de lyso-(^{32}P)-PE formée (39 et 7 nmoles/mg de protéines respectivement avec la fraction E_T). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'action conjuguée d'une phospholipase et d'une lysophospholipase ou d'une lipase. Cependant, si l'activité phospholipasique est mesurée en suivant les transformations de PE exogène, dans tous les cas la somme des quantités de PE et de lyso PE trouvées en fin d'incubation est égale à celle de PE présente au départ. D'autre part, la corrélation observée entre la quantité de phospholipides endogènes hydrolysés et la quantité d'acides gras libérés (35 et 38 nmoles/mg de protéines respectivement dans l'éxpérience rapportée au tableau 13) confirme que des activités lysophospholipasiques ou lipasiques ne sont pas impliquées dans la libération d'acides gras. Enfin, dans les conditions de test de l'activité lipasique, aucune libération d'acides gras n'est observée en absence de glycerides exogènes. On peut donc conclure que contrairement aux autres phospholipases du foie, celle des mitochondries a une action préférentielle sur les phospholipides endogènes. Parmi ces phospholipides endogène, si le cardiolipide est faiblement hydrolysé (tableau 13), par contre 38 % de la PE disparaissent. Environ 8 % de la lécithine présente au départ sont attaqués. La PE est donc attaquée plus rapidement que la PC par la phospholipase mitochondriale, résultat en accord avec ceux de SCHERPHOF (32), WAITE (34) et BJØRNSTAD (36), bien qu'elle soit présente en plus faibles quantités que la PC dans les mitochondries et les membranes mitochondriales (tableau 13 B).

2. Localisation à l'intérieur de la mitochondrie

Le parallélisme observé précédemment entre les activités spécifiques de la monoamine oxydase et de la phospholipase se retrouve lorsque l'on mesure ces activités dans des fractions submitochondriales

T A B L E A U XIII A

Distribution des phospholipides mitochondriaux avant et après action de la phospholipase A mitochondriale

5,2 mg de mitochondries (E_T) sont incubés 1 hr à 37°C dans un tampon triéthanolamine 20 mM pH 8 en présence de $CaCl_2$ 2 mM. Volume final 4 ml.

	Temps 0	1 heure
	% du P lipidique total	
Cardiolipides	10,6	9,8
PE	38,4	23,6
PC + lysoPE	42,1	51,3
lysoPC	2,6	6

T A B L E A U XIII B

Contenu en phospholipides de fractions submitochondriales.

Les fractions membranaires ont été obtenues selon PARSONS et coll.. La fraction "membrane interne" est le culot obtenu après centrifugation de la fraction "membrane interne plus matrice" traitée aux ultrasons.

	P lipidique	PC	PI	PE	CL
	nmole/mg prot.	% du P lipidique total			
Mitochondries	190	41	6	35	15
Membrane interne plus matrice	150	41	3	39	17
Membrane interne	350	40	1	38	21
Membrane externe	500	50	11	35	3

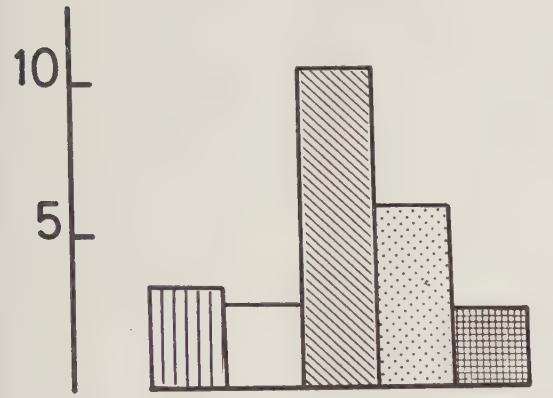
obtenues selon PARSONS et coll. (49) ou selon SCHMITMAN et GREENAWALT (50). Quelle que soit la méthode employée (mesure des acides gras libérés, (figure 13) ou mesure de l'hydrolyse de (^{32}P)-PE (tableau 14)), on observe en effet que ces deux enzymes ont une activité spécifique maximale dans les fractions contenant les membranes externes. On constate également que le pourcentage d'acides gras unsaturés libérés par la phospholipase A de ces membranes est supérieur à celui observé avec les mitochondries de départ.

Il a déjà été signalé plus haut que, dans la mesure ou les phospholipides endogènes sont hydrolysés, la nature de leurs acides gras pouvait intervenir dans la qualité des acides gras libérés par action de la phospholipase et risquait de fausser les interprétations quant au type de la phospholipase impliquée. Or la PE et la PC des membranes mitochondriales ont environ 50 % de leurs acides gras saturés (29). Le fait que les acides gras libérés soient principalement unsaturés ne peut donc être attribué ni à un degré d'unsaturation particulièrement élevé des acides gras des phospholipides membranaires, ni à l'action de phospholipases contaminantes de type A_1, agissant sur ces phospholipides endogènes. D'autre part, le fait que les acides gras libérés soient unsaturés exclut la participation d'une lysophospholipase ou d'une lipase, enzymes dont l'action contribuerait à augmenter le pourcentage d'acides gras saturés.

Si l'activité spécifique de la phospholipase est plus élevée dans les préparations de membranes externes mitochondriales que dans celles de membranes internes (plus matrice), il en est de même pour la phosphatase acide, enzyme de référence des lysosomes. Il a été vu plus haut que l'activité phospholipasique A_2 des membranes de lysosomes allait de pair avec une activité phosphatasique acide environ 20 fois plus élevée que celle observée dans les préparations de membranes externes. La participation de la phospholipase alcaline lysosomiale est donc peu probable. Ceci est confirmé par l'examen des tableaux 15 et 16 où l'on constate que quelle que soit la méthode de mesure utilisée, l'activité phospholipasique alcaline des préparations de membranes externes est au moins égale sinon supérieure à celle de préparations enrichies en lysosomes, alors que les

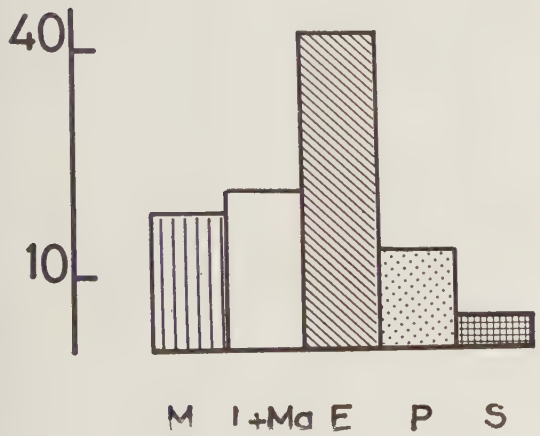
FIGURE 13 : ACTIVITES SPECIFIQUES COMPAREES DE LA PHOSPHOLIPASE ALCALINE ET DES ENZYMES DE REFERENCE DANS LES FRACTIONS SUBMITOCHONDRIALES OBTENUES SELON SCHNAITMAN ET COLL.

Activités spécifiques en nmoles/min./mg prot. et pour la phospholipase, nmoles d'acides gras libérés/mg de protéines en 30 minutes, en présence de 500 nmoles de PE de jaune d'oeuf à pH 8,2 et de $CaCl_2$ 2 mM.



MONOAMINE
OXIDASE

PHOSPHATASE
ACIDE



PHOSPHOLIPASE
ALCALINE

T A B L E A U XIV

Distribution des enzymes de référence et des activités phospholipasiques dans les fractions submitochondriales obtenues selon PARSONS et coll.

	Protéines (mg)	Cyt. c oxydase	M.A.O.	Phosphatase acide	NADPH cyt.c réductase	5'AMPase	Phospho-lipase alcaline
Mitochondries	325	1,5	5,4	48	6	28	1,2
Membranes internes plus matrice	160 (49)	3 (98)	3 (27)	9 (9)	5 (41)	10 (17)	1 (43)
Membranes internes	27,3 (8)	4,5 (25)	3,2 (5)	ND	3 (4)	5 (2)	3,2 (23)
Membranes externes	11,6 (4)	0,6 (1)	37,6 (13)	169 (13)	30 (17)	145 (18)	3,7 (9)

Activités spécifiques en nmoles x min^{-1} x mg^{-1} de protéines, sauf pour la cytochrome c oxydase en µmoles x min^{-1} x mg^{-1}. Entre parenthèses pourcentage de récupération de l'activité totale.

T A B L E A U XV

Acide gras libérés par différentes préparations subcellulaires en présence de PE de jaune d'oeuf à pH 4,5 et 8,1.

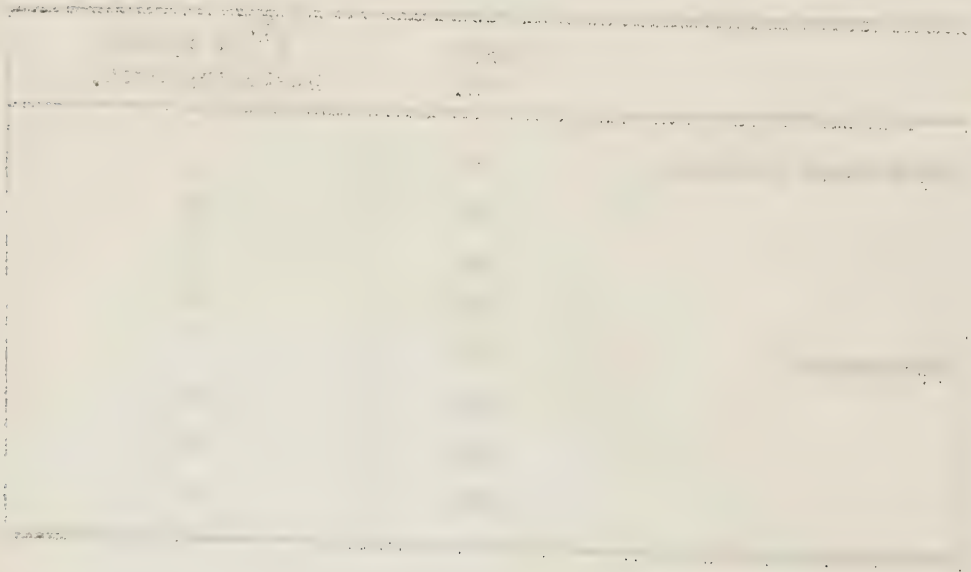
Conditio s d'incubation : 0,4 mg de PE d'oeuf, $CaCl_2$ 2 mM, de 0,3 à 1 mg de protéines, volume final 2 ml, durée 1 heure à 37°C.

	pH	Acide gras libérés (nmoles/mg prot.)	Activité à pH 4,5 / Activité à pH 8
Membrane interne plus matrice	4,5	3	
	8,1	25	0,1
Membrane externe	4,5	16	
	8,1	110	0,2
Membrane de Tritosomes	4,5	266	
	8,1	118	2,2

T A B L E A U XVI

Hydrolyse en fonction du temps de (^{32}P) PE par des préparations de membranes externes mitochondriales et de Tritosomes.
Conditions d'incubation : 300 nmoles de (^{32}P) PE, $CaCl_2$ 2 mM, pH 8,5, volume final 1 ml, 37°C.

	temps min.	(^{32}P) lysoPE nmoles/mg prot.
Membranes externes	0	6
	30	50
	60	64
	90	64
Tritosomes	0	5
	30	12
	60	17
	90	29



activités phosphatasiques acides diffèrent au moins d'un facteur 10.

Au vu des activités spécifiques il semble donc que la phospholipase mitochondriale soit située sur la membrane externe. Cependant, la quantité totale de phospholipase trouvée dans les membranes internes (plus matrice) est très supérieure à celle des membranes externes ; de plus l'activité spécifique de la phospholipase dans les préparations de membranes internes dépourvues d'éléments matriciels est proche de celle observée dans les préparations de membranes externes. Ces observations permettent de tirer deux conclusions : premièrement, compte tenu de la pureté des préparations de membranes internes, l'existence d'une phospholipase mitochondriale ne peut pas être mise en doute ; deuxièrement, on ne peut envisager que la phospholipase mitochondriale soit exclusivement attachée à la membrane externe.

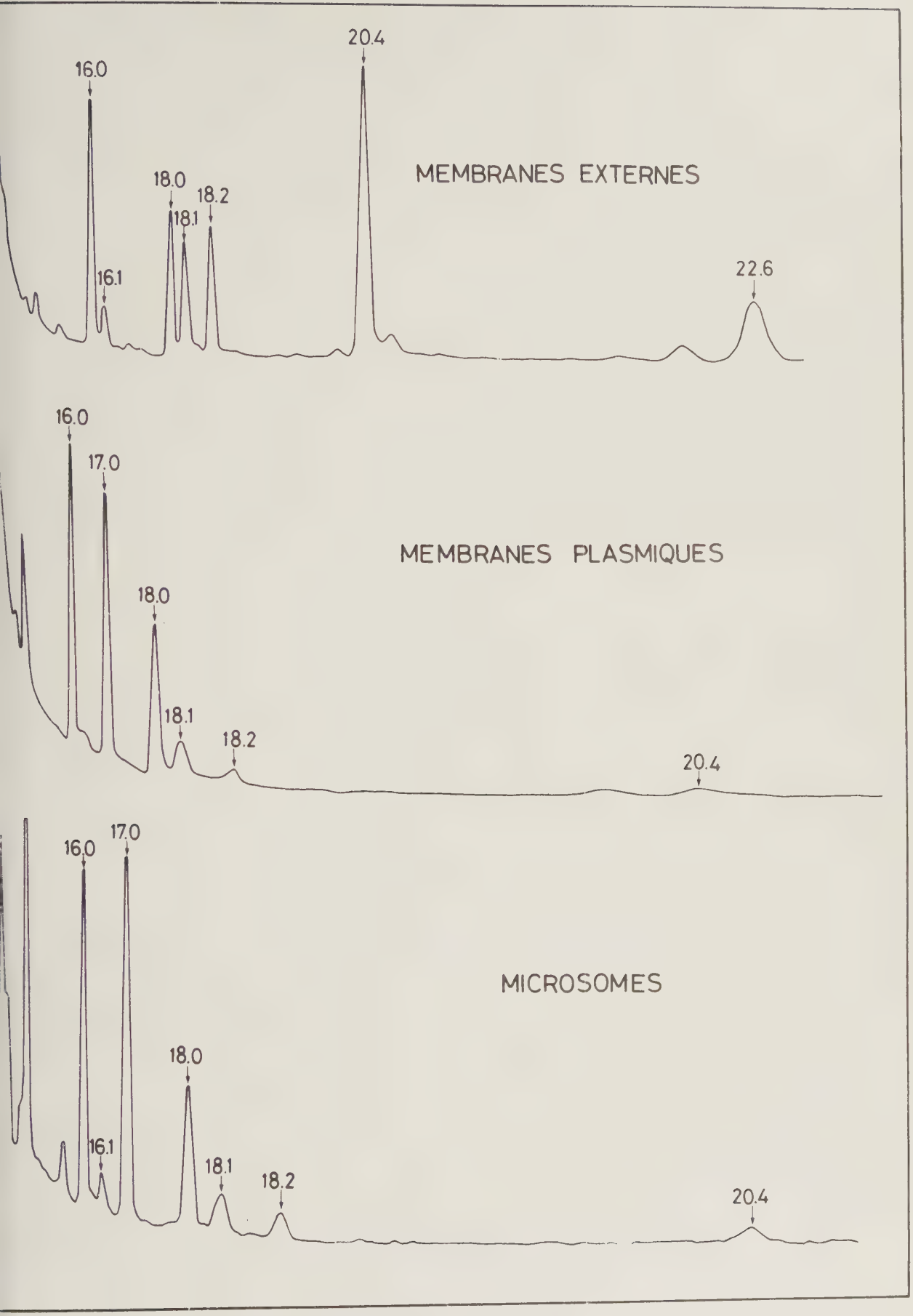
Les phospholipides membranaires mitochondriaux étant les principaux substrats de la phospholipase, cela permet de supposer que cette enzyme est un élément constitutif des membranes mitochondriales au lieu d'être simplement fixée sur l'une des faces de l'une ou l'autre des membranes ; les difficultés rencontrées pour solubiliser cette enzyme sont un indice supplémentaire en faveur de cette hypothèse. En conséquence, l'hypothèse selon laquelle la phospholipase mitochondriale serait située à des points de jonction (137) entre les deux membranes semble être celle qui rende le mieux compte des faits expérimentaux présentés ici.

L'une des caractéristiques de la phospholipase mitochondriale est qu'elle semble s'attaquer de préférence aux liaisons ester d'acide arachidonique (C 20:4) (tableau 9 et figure 14). Pour ce qui est des phospholipases A_1 de microsomes ou de membranes plasmiques l'acide palmitique est le principal acide gras saturé libéré. En effet, le pourcentage d'acide arachidonique dans les acides gras unsaturés passe d'environ 45 % dans les phospholipides substrats de l'enzyme à 55 % dans les acides gras unsaturés libérés par la phospholipase mitochondriale.

FIGURE 14 : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ACIDES GRAS LIBERES PAR LES PHOSPHOLIPASES DE MEMBRANES EXTERNES MITOCHONDRIALES, DE MEMBRANES PLASMIQUES ET DE MICROSOMES.

Condition d'incubation :

0,2 mg de protéines, PE 200µM, pH 9, $CaCl_2$ 2 mM, KCl 0,1 M, volume 2 ml, 30 minutes à 37°C. Extraction et analyse des acides gras cf. méthodes.
L'acide heptadécanoïque (17:0) est utilisé comme standard interne.


16.0
20.4
MEMBRANES EXTERNES
18.0
18.2
18.1
16.1
22.6
16.0
17.0
MEMBRANES PLASMIQUES
18.0
18.1
18.2
20.4
16.0
17.0
MICROSOMES
18.0
16.1
18.1
18.2
20.4

Bien que relativement faible (10 %) cette variation est toujours observée quel que soit le type des préparations de mitochondries ou de fractions submitochondriales. Une variation du même ordre est observée si l'on examine le pourcentage d'acide palmitique parmi les acides gras saturés libérés par les phospholipases A_1 de microsomes ou de membranes plasmiques. Une tentative d'explication peut être proposée en se référant aux travaux de Salem (138) et de Van Deenen (4) qui ont montré que la surface occupée par une molécule dans un film de phospholipides augmentait avec le degré d'unsaturation des acides gras constitutifs, une même augmentation étant observée lors d'une diminution du nombre d'atomes de carbone de ces acides gras. Les molécules étant alors moins serrées, elles deviennent plus facilement accessibles à des agents extérieurs tels que les phospholipases. Ces enzymes agiraient donc de préférence sur les molécules contenant un acide palmitique en 1 pour les phospholipases A_1 ou un acide gras hautement unsaturé (acide arachidonique) en 2 pour la phospholipase A_2.

Les caractéristiques cinétiques de la phospholipase mitochondriale ont été mesurées dans des préparations de membranes externes et de membranes internes, en utilisant la même émulsion de (^{32}P)-PE (figures 15) ce qui permet de comparer les valeurs obtenues. Des Km apparents différents ont été trouvés pour les activités phospholipasiques des membranes externes et des membranes internes : 90 et 300 µM respectivement. Ceci n'implique pas nécessairement qu'il s'agisse de deux enzymes différentes : les propriétés physiques (en particulier la répartition des charges électriques) des deux membranes sont différentes (139) et peuvent donc modifier l'activité phospholipasique par leurs interactions avec les micelles de substrat.

Enfin, comme dans le cas des autres phospholipases, il existe une relation à première vue linéaire entre la concentration en protéines dans le tube d'essai et la quantité de substrat exogène hydrolysée (figure 15). Cependant, et ceci se vérifie avec toutes les phospholipases du foie, cette relation n'est strictement linéaire qu'au delà de 100 µg de protéines par ml. Ce point sera discuté plus loin.

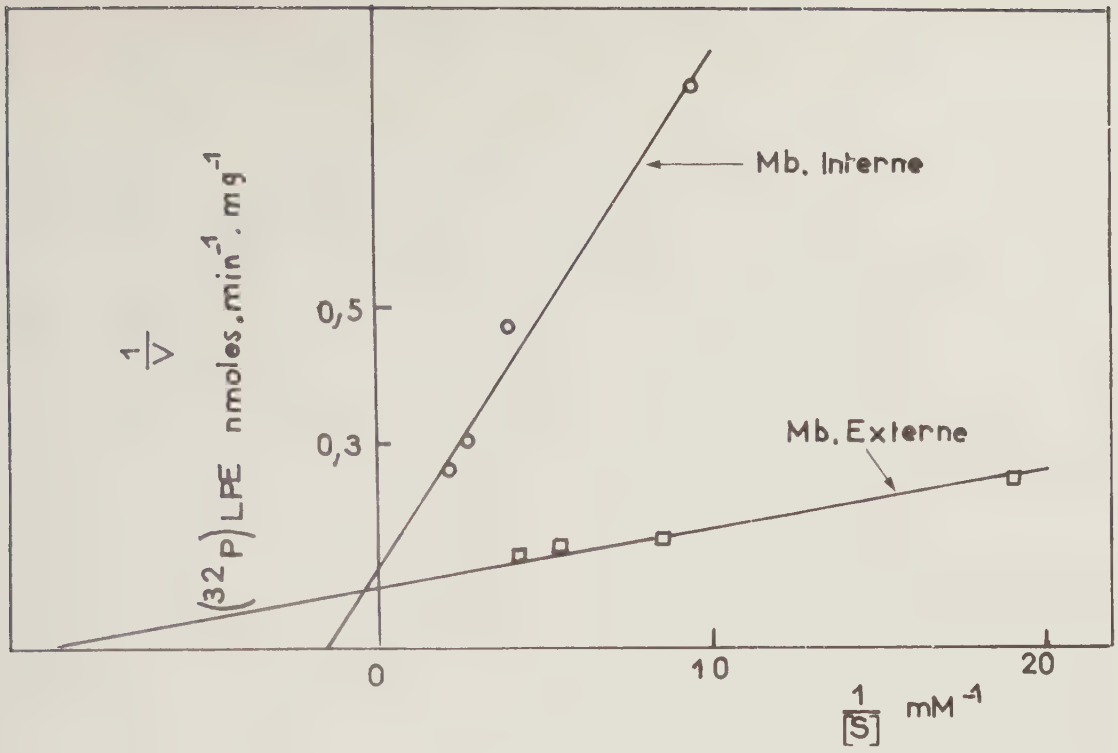
FIGURE 15 : ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DANS LES PREPARATIONS DE MEMBRANES INTERNES ET EXTERNES MITOCHONDRIALES

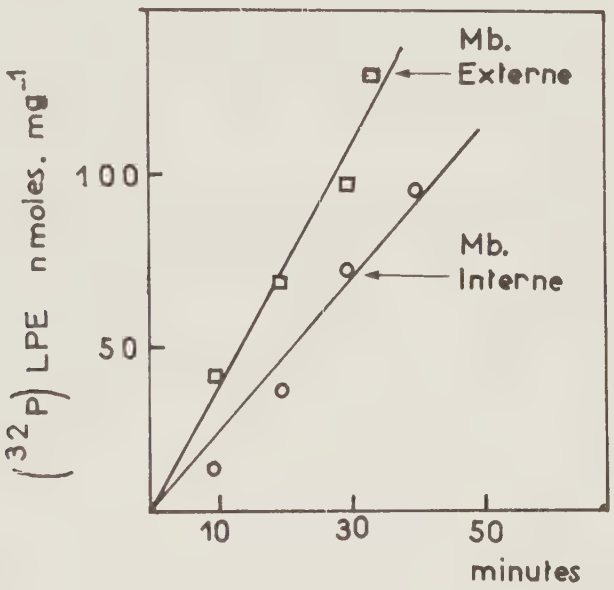
A - en fonction de la concentration en substrat
membranes internes (0,124 mg prot.) Km = 400µM, V_{max} 10,4 nmoles/min./mg prot.
membranes externes (0,077 mg prot.) Km = 90µM, V_{max} = 10 nmoles/min./mg prot.

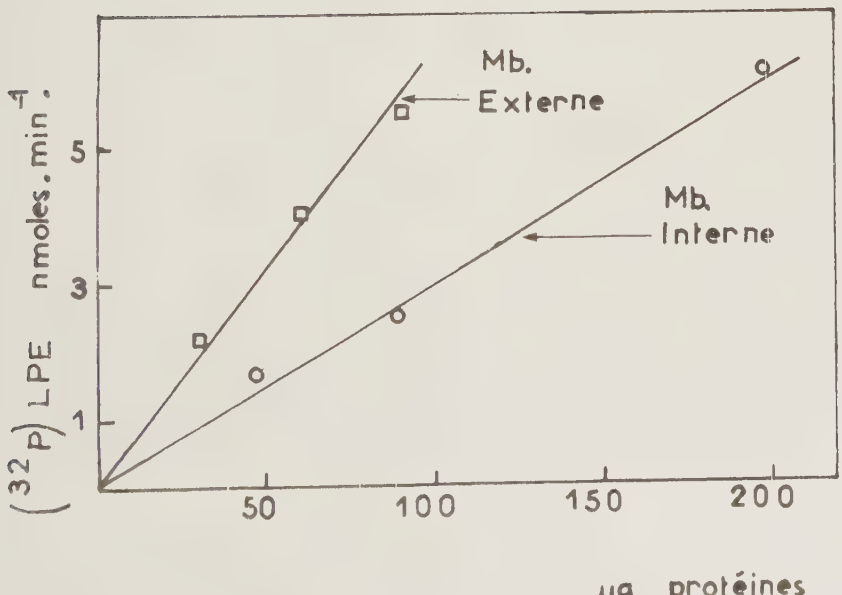
B - en fonction du temps : membranes internes 0,6 mg, membranes externes 0,12 mg.

C - en fonction de la concentration en protéines

Conditions d'incubation :
(^{32}P) PE 200 nmoles, pH 9, $CaCl_2$ 2 mM et KCl 0, 1 M, 15 minutes à 37°C.


Mb. Interne
Mb. Externe
0,5
0,3
0
10
20
$\frac{1}{V}$
(^{32}P) LPE nmoles.min^{-1}.mg^{-1}
$\frac{1}{[S]}$ mM^{-1}


Mb. Externe
Mb. Interne
100
50
10
30
50
minutes
(^{32}P) LPE nmoles. mg^{-1}


Mb. Externe
Mb. Interne
5
3
1
50
100
150
200
µg protéines
(^{32}P) LPE nmoles.min^{-1}.

IV - DISCUSSION DU CHAPITRE III

Les résultats présentés ici permettent de tirer trois conclusions :

1 - existence d'une phospholipase mitochondriale de type A_2 située sur la membrane externe ou plus probablement à des points de jonction entre les deux membranes mitochondriales.

2 - existence d'une phospholipase de type A_1 dans les microsomes et les membranes plasmiques.

3 - existence d'une activité phospholipasique acide soluble de type $A_1 + A_2$ dans les lysosomes. L'activité phospholipasique alcaline de type A_2 détectée dans ces organelles est faible et est liée aux membranes.

La première conclusion est dans ses grandes lignes, en accord avec les résultats de BJØRNSTADT (31) et de SCHERPHOF et coll. (32) et a été confirmée depuis, en ce qui concerne la localisation de la phospholipase mitochondriale, par WAITE (34). Cependant quelques différences sont à relever. La première concerne l'hydrolyse des substrats endogènes mitochondriaux. Si BJØRNSTAD (31) trouve également que les phospholipides membranaires mitochondriaux sont hydrolysés préférentiellement à des substrats exogènes, les résultats de WAITE (37) n'indiquent pas de différence d'activité selon l'origine des phospholipides. Ce désaccord est peut être dû à la présence de Triton X 100 dans le milieu d'incubation utilisé par WAITE.

Une seconde différence est observée à propos de la nature des acides gras relâchés. Quel que soit le type de fraction submitochondriale testée, l'acide arachidonique est le principal acide gras libéré, tandis que par action d'une phospholipase mitochondriale récemment purifiée 160 fois (140), l'acide oléique est le principal acide gras libéré. Il semble que cette différence puisse être attribuée soit à l'alimentation des rats, alimentation dont la composition peut modifier

la répartition des acides gras dans les lipides des tissus animaux (141), soit au fait que la phospholipase se comporte de façon différente lorsqu'elle est au sein d'une membrane ou lorsqu'elle est sous forme soluble. Dans ce dernier cas, la fixation de l'enzyme sur les micelles de substrat n'est plus gênée par la membrane environnante et le fait que les molécules de PE ayant un acide arachidonique soient un peu plus accessibles que les autres, a moins d'importance.

La troisième différence concerne la localisation de la phospholipase mitochondriale. Si WAITE (34) a remarqué que cette enzyme ne pouvait être localisée exclusivement au niveau de la membrane externe mitochondriale, les résultats présentés ici permettent de poser le problème de la localisation de façon différente. Si l'activité spécifique de la phospholipase est plus grande dans les préparations de membranes externes mitochondriales que dans celles de membranes internes, par contre l'inverse est observé à propos des activités totales récupérées dans ces fractions submitochondriales. De plus l'activité spécifique mesurée dans des préparations de membranes internes pratiquement dépourvues d'éléments matriciels n'est que légèrement inférieure à celle mesurée dans des préparations de membranes externes. Enfin les variations de l'activité phospholipasique mitochondriale ne peuvent exactement être calquées sur celles des enzymes de référence des deux membranes mitochondriales et semblent suivre une voie intermédiaire. Cette enzyme n'étant pas facilement solubilisable et ne pouvant donc être localisé dans l'espace intermembranaire mitochondrial, une double localisation doit être envisagée comme étant la plus probable : localisation à des points de jonction entre les deux membranes.

La seconde conclusion que l'on peut tirer des expériences rapportées dans ce chapitre est la confirmation de l'existence d'une phospholipase A_1 dans les microsomes et les membranes plasmiques. Si nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres équipes (45) en ce qui concerne la phospholipase des microsomes et (45,42) en ce qui concerne celle des membranes plasmiques, par contre nous avons obtenu des résultats incompatibles avec ceux de VICTORIA (43) et Van GOLDE (44) au sujet de la nature de la phospholipase des membranes

plasmiques. En effet, pour ces auteurs, la phospholipase des membranes plasmiques est de type A_2, a un pH optimum d'activité égal à 8 et présente une activité maximale en présence de calcium 10 mM tandis que nos résultats indiquent un pH optimum égal à 9, une inhibition par des concentrations en calcium supérieures à 5 mM et une spécificité de type A_1. A l'heure actuelle, aucune explication n'a encore pu être trouvée pour rendre compte de ces oppositions. Quoi qu'il en soit, l'activité phospholipasique que nous avons pu mettre en évidence se distingue de celle des microsomes d'une part en raison de son pH optimum et d'autre part en raison de ses caractéristiques cinétiques. Si ces différences confirment que l'on est bien en présence de deux activités phospholipasiques distinctes, la possibilité selon laquelle il s'agirait de la même enzyme fixée sur des membranes différentes n'est pas exclue pour autant.

La dernière conclusion que l'on peut tirer des expériences de ce chapître concerne les lysosomes. Nos résultats confirment l'existence de deux phospholipases A acides solubles qui peuvent être distinguées non seulement par leurs caractéristiques physiques (comportement sur tamis moléculaire (39)) mais aussi par leurs caractéristiques cinétiques : en effet leurs vitesses maximales d'action et leurs Km sont différents. Ces deux enzymes possèdent des Km très élevés par rapport à ceux trouvés pour les autres phospholipases du foie de rat. Elles se distinguent également des phospholipases alcalines par l'effet inhibiteur des ions calcium et potassium, effet qui peut s'expliquer par l'influence de ces ions sur le potentiel superficiel des micelles de substrat.

A pH alcalin il a toujours été possible de détecter une activité phospholipasique A_2 lysosomiale. Cette activité est d'un niveau très faible par rapport à l'activité phospholipasique acide et est liée à la membrane lysosomiale. La présence d'une phospholipase A_2 dans les membranes de lysosomes ne permet pas de rendre compte des activités phospholipasiques A_2 d'autres organelles subcellulaires par le biais de contaminations, comme l'a suggéré Rahman (36) qui a mis en doute

l'existence de la phospholipase mitochondriale. En effet cette activité phospholipasique A_2 lysosomiale va de pair avec une activité phosphatasique acide très élevée. En conséquence l'activité phospholipasique alcaline A_2 des fractions qui possèdent de faibles activités phosphatasiques acides ne saurait être d'origine lysosomiale, ce qui est en particulier le cas des préparations de mitochondries. D'autre part les valeurs des activités phospholipasiques lysosomiales trouvées par Rahman sont très différentes de celles que nous avons mesurées. Cette différence peut s'expliquer par les quantités de substrat extrêmement faibles utilisées par cet auteur (25 µM), ce qui laisse à penser que ses conditions de test n'étaient pas optimales.

D'un point de vue plus général, quelques remarques concernant toutes les phospholipases du foie de rat peuvent être faites. Dans tous les cas, l'activité phospholipasique varie de façon linéaire avec la concentration en protéines, en première approximation tout au moins. En réalité, on n'observe une linéarité rigoureuse qu'au delà de concentrations en protéines supérieures à environ 100 µg/ml : en dessous de cette limite, lorsque la concentration en protéines décroît, l'activité spécifique croît, alors qu'elle devrait rester constante. Etant donné que la concentration en substrat reste constante, un tel phénomène peut suggérer la présence d'un inhibiteur dans la solution protéique. La concentration de cet inhibititeur croît avec celle des protéines et peut devenir par rapport à la quantité de substrat telle qu'une inhibition soit observée. L'isolement récent de peptides inhibiteurs des activités phospholipasiques de venin de serpent indique que cette hypothèse n'est pas à exclure (142). Une seconde possibilité est que l'inhibiteur soit l'un des produits de la réaction. Il s'avère en effet que la lyso-PE inhibe l'activité de la phospholipase mitochondriale, soit lorsque cette enzyme est au sein de mitochondries entières, ce que nous avons vérifié, soit lorsqu'elle est partiellement purifiée (140). Nous avons également constaté que, dans le cas où les émulsions de PE utilisées contenaient au départ plus de 10 % de lyso-PE, dégradation due aux ultrasons, les activités phospholipasiques des lysosomes, microsomes et des mitochondries étaient fortement diminuées. Une troisième explication pourrait être l'influence des phénomènes de diffusion dans un milieu hétérogène (micelles phospholipidiques et

membranes insolubles) (143). La plupart des expériences rapportées ici étant d'ordre plus qualitatif que quantitatif, le problème de la quantité de protéines présente dans une mesure d'activité phospholipasique n'a donc qu'une faible incidence sur les résultats obtenus. Par contre cette question devra être étudiée avec soin si l'on envisage de purifier ces enzymes et donc de pouvoir évaluer de façon précise le taux de purification de chaque étape du traitement.

Comme cela a été souligné dans les premières pages de cet exposé, la mise en évidence d'une activité phospholipasique mitochondriale permet d'envisager que les phospholipides, par les transformations chimiques qu'ils subissent, peuvent jouer un rôle actif dans le fonctionnement des mitochondries. L'hypothèse la plus simple consiste à supposer que les lysophospholipides formés par action de la phospholipase mitochondriale sont réacylés in situ. De tels cycles déacylation-réacylation des phospholipides pourraient être impliqués dans la régulation de phénomènes membranaires par l'intermédiaire de la création momentannée de sites moins hydrophobes. La corrélation existant entre l'activité phospholipasique mitochondriale et les propriétés de gonflement des mitochondries (144,145) indique que les phospholipides ont un rôle dynamique dans les changements d'états lents (10 minutes) des mitochondries. Le fait que la phospholipase mitochondriale agisse essentiellement sur les phospholipides endogènes renforce cette hypothèse. Mais la majorité des phénomènes membranaires sont rapides et il ne semble pas que l'activité phospholipasique ait une vitesse d'action comparable. Enfin, l'existence même d'une activité lysophospholipide-acyl transférase mitochondriale ayant été mise en doute (91), nous avons réexaminé ce point : la présence de cette activité dans la membrane externe ou mieux dans la membrane interne mitochondriale permettrait en effet de mieux définir les rôles de la phospholipase et des phospholipides mitochondriaux.

C H A P I T R E IV

LA PHOSPHOLIPASE A MITOCHONDRIALE ET LE RENOUVELLEMENT DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES

1. INCORPORATION D'ACIDE (^{14}C) OLEIQUE DANS LA PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE ET LA PHOSPHATIDYLCHOLINE

A. Comparaison entre mitochondries et microsomes

Le but des expériences rapportées dans ce chapître est de voir si les mitochondries sont capables ou non d'incorporer de l'acide oléique dans leurs phospholipides, ce qui suppose donc qu'au préalable une liaison ester de la molécule phospholipidique ait été hydrolysée. Dans ce cas la contamination des préparations mitochondriales par les microsomes est le problème majeur puisque certains auteurs (91, 145) sont arrivés à la conclusion que les capacités d'acylation des phospholipides dans les cellules de foie seraient le fait des seuls microsomes.

Le milieu d'incubation utilisé contient de l'ATP, du coenzyme A et de l'acide (^{14}C)-oléique. Nous avons donc supposé que les fractions testées contenaient une acyl-CoA synthétase capable de former de l'oléyl-CoA, et que l'activité de cette enzyme n'était pas le facteur limitant dans le processus complet d'acylation des lysophosphatides. De telles enzymes ont effectivement été mises en évidence dans la membrane externe mitochondriale et dans les microsomes (146).

Les premières expériences réalisées sur des préparations de mitochondries révélèrent effectivement la présence d'enzymes capables d'incorporer des acides gras dans les phospholipides de ces préparations. Plusieurs faits laissaient à penser que les mitochondries étaient capables de réaliser à elles seules ces acylations : l'ATP mitochondrial est presque suffisant (figure 16) la réaction est linéaire durant les 20 première minutes et le pH optimum (figure 17) est voisin de celui de la phospholipase A mitochondriale. Cependant on constate que la carnitine n'augmente pas l'incorporation d'acide oléique dans la PE ou la PC. Or la carnitine est un cofacteur nécessaire au transport des acyl-CoA au travers de la membrane interne mitochondriale (147,148). En conséquence

FIGURE 16 : INCORPORATION D'ACIDE (^{14}C) OLEIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ATP DANS la PE ET LA PC DES MITOCHONDRIES ET DES MICROSOMES (B)

Conditions d'incubation cf. tableau 17

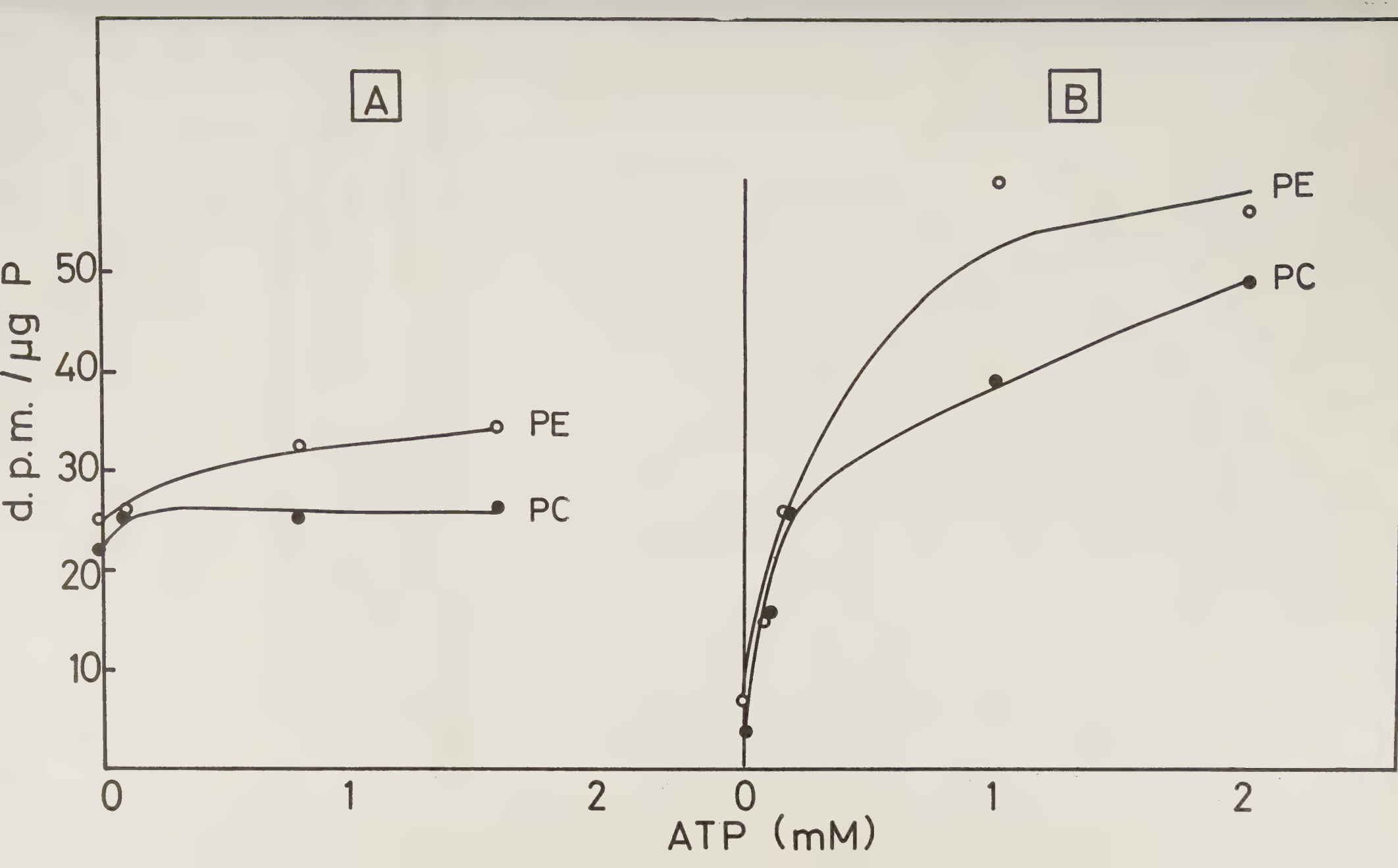
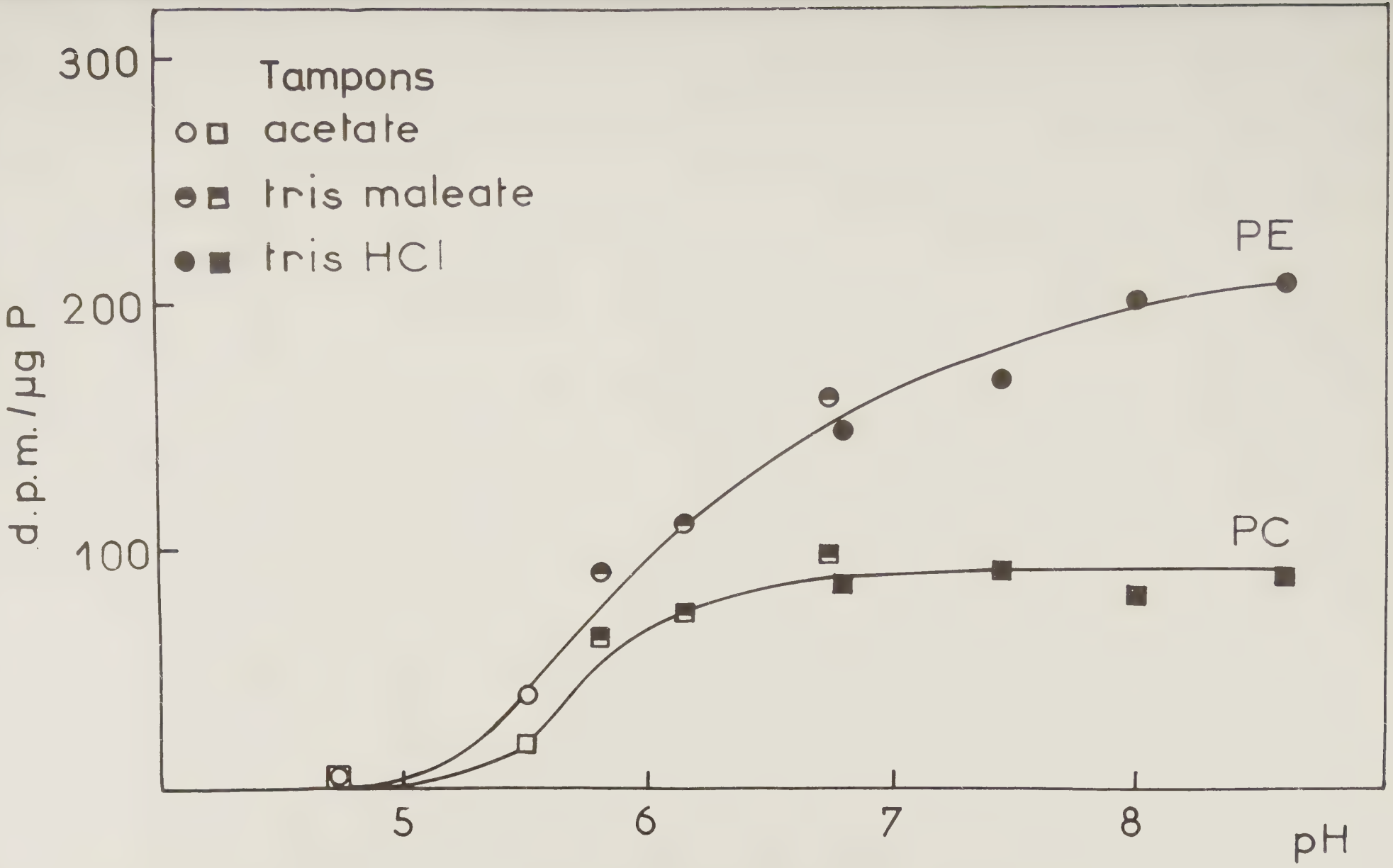

A
B
PE
PC
PE
PC
d.p.m. / µg P
50
40
30
20
10
0
1
2
0
1
2
ATP (mM)

FIGURE 17 : EFFET DU pH SUR L'INCORPORATION D'ACIDE (^{14}C) OLEIQUE DANS LES PHOSPHOLIPIDES DE MEMBRANE INTERNE MITOCHONDRIALE

Conditions d'incubation :

0,2 nmole (^{14}C) oléate, ATP 20 mM, $MgCl_2$ 25 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, CoA 0,5 mM, NaF 0,2 M, tampon Triéthanolamine 40 mM pH 8, 6 mg de protéines, volume 2 ml,30 minutes à 37°C.


Tampons
acetate
tris maleate
tris HCl
PE
PC
300
200
100
d.p.m./µg P
5
6
7
8
pH

ou bien les enzymes responsables de l'oxydation des acides gras présents dans la matrice mitochondriale (148) interdisent par leur action toute utilisation à d'autres fins que celle de l'oxydation, ou bien les acylations observées sont réalisées soit au niveau de la membrane externe mitochondriale soit même par des systèmes enzymatiques extérieurs aux mitochondries.

Afin d'étudier cette seconde hypothèse, les capacités de réacylation des microsomes ont été testées dans les mêmes conditions que celles des mitochondries. On constate que dans ce cas l'ATP exogène est un cofacteur nécessaire (figure 16 B) et que le pH optimum est identique à celui trouvé précédemment, la réaction étant linéaire durant les 20 premières minutes. Compte tenu des similitudes avec le cas des mitochondries, et puisque l'ATP mitochondrial peut être échangé très rapidement contre de l'ADP exogène (149), on peut penser que l'incorporation d'acide (^{14}C)-oléique dans la PE et la PC des mitochondries est le fait des seuls microsomes contaminants. Une première possibilité est que les phospholipides, après avoir reçu une molécule d'acide oléique au niveau des microsomes soient échangés contre des phospholipides mitochondriaux. Dans nos conditions expérimentales aucun échange entre des phospholipides radioactifs des microsomes et des phospholipides "froids" des mitochondries ou inversement, n'est observé, ce qui d'une part infirme cette hypothèse et d'autre part est une confirmation indirecte des observations selon lesquelles une protéine soluble du cytoplasme est nécessaire pour que ce réalise un tel échange (150). La seconde possibilité est que les phospholipides des microsomes soient en fait les seuls à être marqués par l'acide (^{14}C)-oléique et que les faibles radioactivités spécifiques observées dans les phospholipides mitochondriaux soient la conséquence des faibles quantités de microsomes contaminants les préparations mitochondriales utilisées.

B. Origine des enzymes catalysant l'incorporation d'acide oléique dans les phospholipides des membranes mitochondriales

Le test mis en oeuvre a été de mesurer l'activité de réacylation des membranes mitochondriales en présence de quantités croissantes de

microsomes, la contamination initiale des préparations étant évaluée à l'aide des activités des enzymes de référence. Une extrapolation vers un zéro de contamination par les microsomes doit permettre d'attribuer ou non une activité de réacylation aux membranes mitochondriales.

Si pour les membranes internes une contamination nulle correspond à une activité de réacylation nulle, pour les membranes externes la quantité de radioactivité incorporée dans la PC pour une contamination nulle est inférieure ou égale, selon les enzymes de référence utilisées, à la quantité mesurée au temps zéro (figure 18). Pour la PE un résultat similaire est obtenu. Nous concluons donc que les microsomes sont très probablement les seuls responsables des activités de réacylation observées dans les préparations mitochondriales ou submitochondriales.

Si donc la PE et la PC ne peuvent être sujettes à des cycles de déacylation-réacylation dans les mitochondries, par contre une incorporation est observée dans un composé X, incorporation augmentant avec la quantité de microsomes présents dans la préparation, mais très supérieure à zéro pour une contamination nulle. Ce composé a été identifié à de l'acide phosphatidique à l'aide de différents systèmes de chromatographie sur couche mince (systèmes acide et basique n° 2 et 3 en particulier).

II. FORMATION DES ACIDES PHOSPHATIDIQUES ET LYSOPHOSPHATIDIQUES

A. Par incorporation d'acide (^{14}C)-oléique

L'étude de l'incorporation d'acide (^{14}C)-oléique dans l'acide phosphatidique a été entreprise en vue de déterminer si la phospholipase A mitochondriale était impliquée dans ce phénomène. Bien que présent en très faibles quantités dans les mitochondries (moins de 1 % des phospholipides totaux) ce corps est très important d'une part en raison de ses propriétés physiques (caractère "acide" très marqué) et d'autre part parce qu'il est le point de départ du métabolisme des phospholipides.

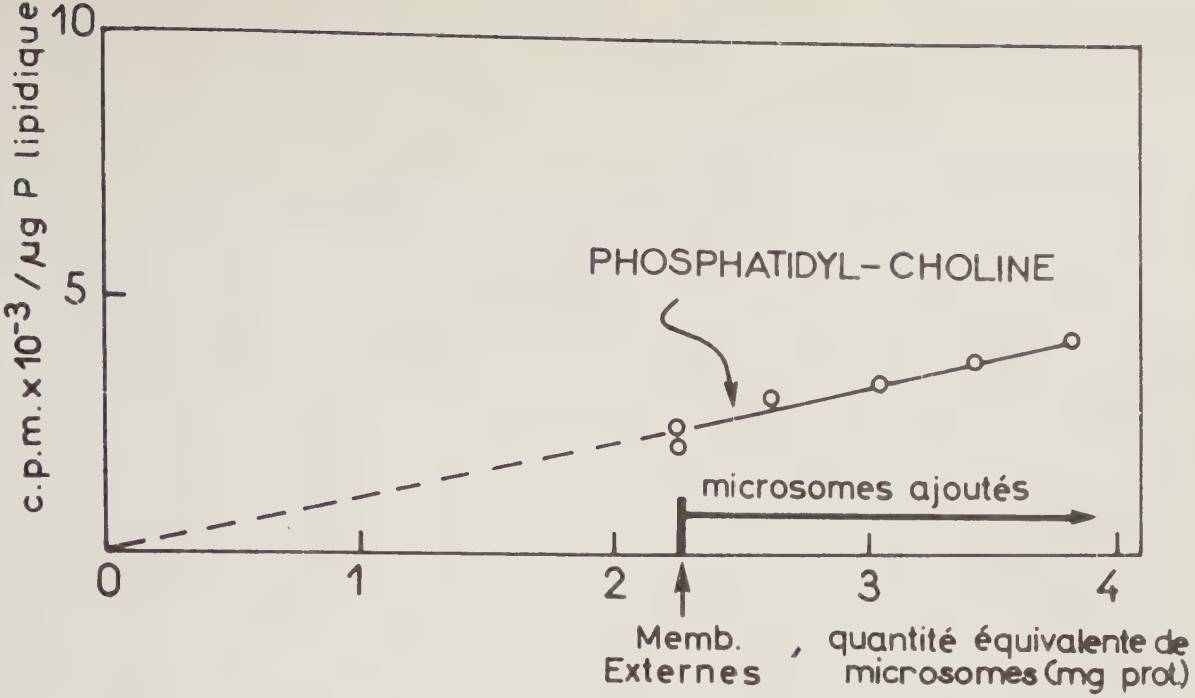
FIGURE 18 : INCORPORATION D'ACIDE (^{14}C) OLEIQUE DANS LES PHOSPHOLIPIDES DE

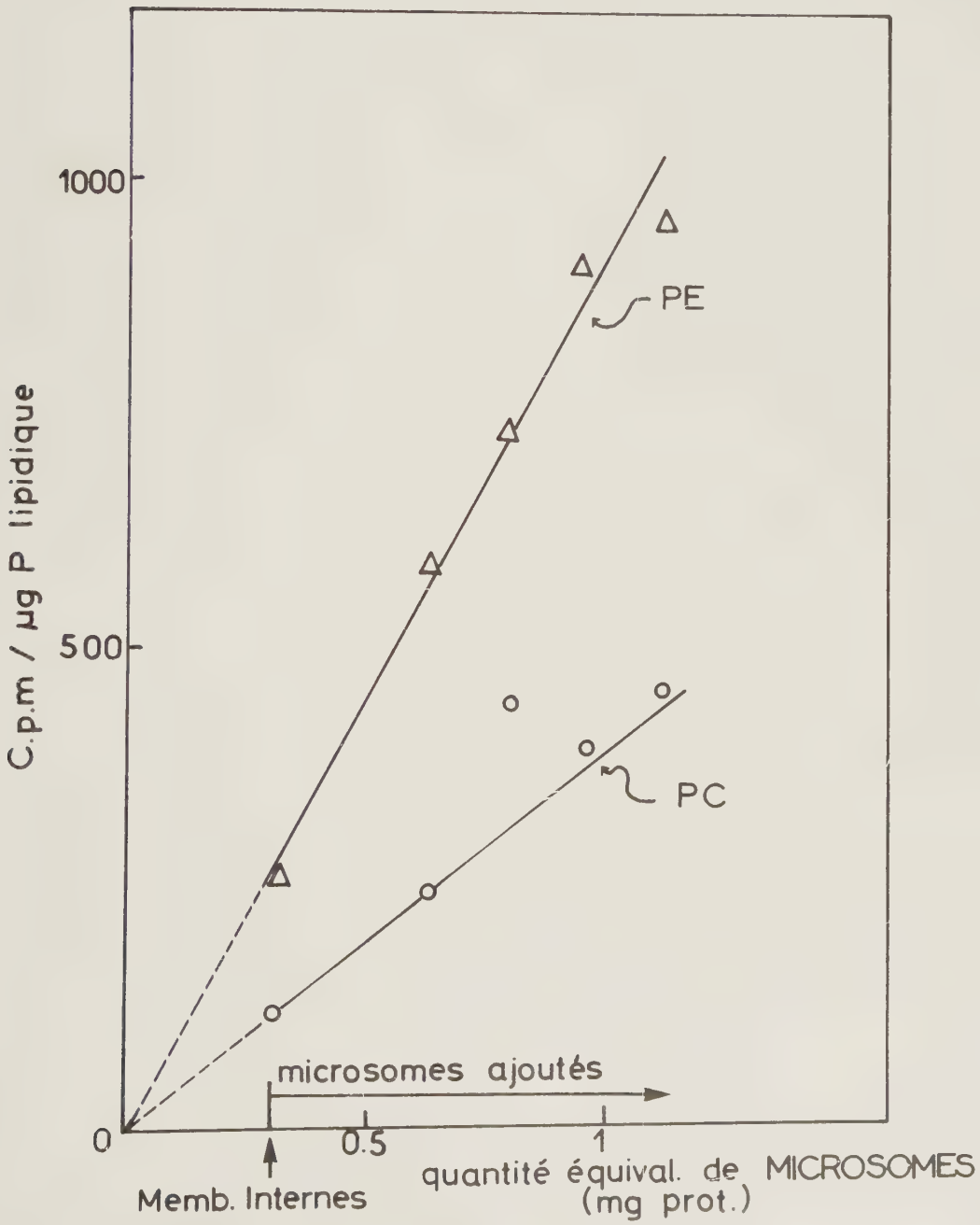
A - MEMBRANES EXTERNES

B - MEMBRANES INTERNES

EN FONCTION DE QUANTITES CROISSANTES DE MICROSOMES

Mêmes conditions d'incubation que dans la figure 17


c.p.m. x 10⁻³ / µg P lipidique
10
5
PHOSPHATIDYL-CHOLINE
microsomes ajoutés
0
1
2
3
4
Memb. Externes
quantité équivalente de microsomes (mg prot.)


C.p.m / µg P lipidique
1000
500
0
PE
PC
microsomes ajoutés
0.5
1
Memb. Internes
quantité équival. de MICROSOMES (mg prot.)

Le tableau 17 résume les principaux résultats obtenus. Durant des périodes d'incubation assez courtes (10 à 15 minutes) et quelles que soient les fractions considérées, l'acide (^{14}C)-oléique est incorporé essentiellement dans trois phospholipides : l'acide phosphatidique, (AP), l'acide lysophosphatidique (ALP) et un lipide ayant le même R_f que du phosphatidyl-glycérol authentique. Des traces de radioactivité seulement sont détectées dans les autres phospholipides (PE et PC). La fraction "membrane interne plus matrice" semble totalement incapable d'incorporer l'acide oléique dans les acides phosphatidiques ou lysophosphatidiques. Ce résultat pourrait s'expliquer par la faible activité de l'acyl-CoA-synthétase-ATP dépendante de cette fraction. De même, les membranes plasmiques n'incorporent pratiquement pas d'acide (^{14}C)-oléique dans les acides phosphatidiques, que le milieu contiennent ou non le précurseur direct de ce phospholipide : le sn-glycérol-3-phosphate ; ce résultat peut aussi s'expliquer par l'absence d'une acyl-CoA-synthétase. Par contre la membrane externe mitochondriale et les microsomes incorporent rapidement l'acide (^{14}C) oléique dans l'acide lysophosphatidique en ce qui concerne les membranes externes et dans l'acide phosphatidique en ce qui concerne les microsomes. D'après l'activité de la NADPH cytochrome c réductase, la contamination des membranes externes par les microsomes peut être évaluée à environ 20 %.En comparant ce taux de contamination aux quantités d'acide (^{14}C)-oléique incorporées dans l'acide lysophosphatidique respectivement dans les membranes externes et les microsomes, on peut conclure que cette incorporation est réalisée par des enzymes appartenant exclusivement à la membrane externe mitochondriale.

La capacité de la membrane externe mitochondriale d'incorporer de l'acide (^{14}C)-oléique dans l'acide lysophosphatidique n'est que peu modifiée par la présence ou l'absence de glycérol-3-phosphate (utilisé jusqu'à une concentration 3 mM) ; ceci conduit à supposer que les enzymes impliquées dans la formation d'acide lysophosphatidique utilisent essentiellement des précurseurs endogènes. Par contre l'incorporation d'acide (^{14}C)-oléique dans l'acide phosphatidique des microsomes est essentiellement dépendante de la présence de sn-glycérol-3-

T A B L E A U XVII

Formation d'acides phosphatidique et lysophosphatidique radioactifs par incorporation d'acide (^{14}C)-oléique

Conditions d'incubation : 37°C, 10 min. volume total 1,5 ml, 4 à 6 mg protéines. Acide (^{14}C)-oléique 0,4 mM : CoA 0,5 mM ; ATP 0,4 mM ; $MgCl_2$ 1 mM ; tampon Tris - HCl 20 mM, pH 7,8, NaF 30 mM.

	Glycérol-3-phosphate (µmole)	Acide phosphatidique (2)	Acide lysophosphatidique (2)
Membrane interne plus matrice	0	ND(1)	ND(1)
	1	ND	ND
Membrane externe	0	2700	10600
	1	2500	8900
	5	2900	10311
Microsomes	0	1000	3700
	1	30700	4160
	5	118700	3400
Membrane plasmique	0	ND	ND
	1	800	500

(1) ND non détecté

(2) Exprimé en dpm/mg protéines. Activité spécifique de l'acide (^{14}C)-oléique : 8800 dpm/nmole.

phosphate.

Le système enzymatique microsomial semble être réparti uniformément sur les deux types de membranes qui le composent : lisses et rugueuses (tableau 18). Le taux de membrane plasmique contaminant les microsomes, le réticulum lisse et le réticulum rugueux est nettement différent dans chacune de ces trois fractions (29) ; cependant ces trois fractions ne diffèrent pratiquement pas dans leurs activités d'acylation du sn-glycérol-3-phosphate. Ce fait suggère indirectement que les membranes plasmiques n'ont qu'une activité négligeable par rapport à celles des microsomes ou des membranes externes dans le métabolisme de l'acide phosphatidique.

En vue de déterminer les voies de biosynthèse des acides phosphatidiques dans les membranes externes et les microsomes, la cinétique de l'incorporation a été mesurée entre 1 et 10 minutes (figures 19 A et B). Les courbes obtenues sont linéaires au moins durant les 5 premières minutes et ne permettent pas de conclure à une incorporation séquentielle d'acide oléique dans l'acide lysophosphatidique puis dans l'acide phosphatidique ou vice et versa. Cependant dans le cas des microsomes, compte tenu de la faible quantité d'acide lysophosphatidique formée, même lorsque l'acylation du glycérol-3-phosphate en acide phosphatidique est très intense, on peut penser que cette acylation est le fait d'un complexe enzymatique agissant sans libérer le produit intermédiaire qu'est l'acide lysophosphatidique.

La première hypothèse permettant d'expliquer l'accumulation d'acide lysophosphatidique dans les mitochondries consiste à supposer que la phospholipase A mitochondriale agit sur l'acide phosphatidique beaucoup plus rapidement que l'acyl-glycérol-3-phosphate acyl transférase sur l'acide lysophosphatidique. Compte tenu des faibles quantités d'acide phosphatidique présentes dans les mitochondries (moins de 1 % des phospholipides totaux), l'emploi de traceurs radioactifs ((^{32}P) phosphate) a été nécessaire pour étudier l'action de la phosphalipase mitochondriale sur l'acide phosphatidique endogène.

TABLEAU XVIII

Formation d'acides phosphatidique et lysophosphatidique au niveau des membranes de réticulum endoplasmique

	Glycérol-3-phosphate	Acide phosphatidique (1)	Acide lysophosphatidique (1)
Microsomes	-	4150	1800
	+	173000	5440
Réticulum lisse	-	1500	2100
	+	166000	4400
Réticulum rugueux	-	3700	1500
	+	124000	3200

(1) Exprimé en dpm/mg protéines - Activité spécifique de l'acide (^{14}C) oléique : 8800 dpm/nmole. Mêmes conditions d'incubation que dans le tableau XVII et, lorsqu'il est présent, 5 µmoles de glycérol-3-phosphate.

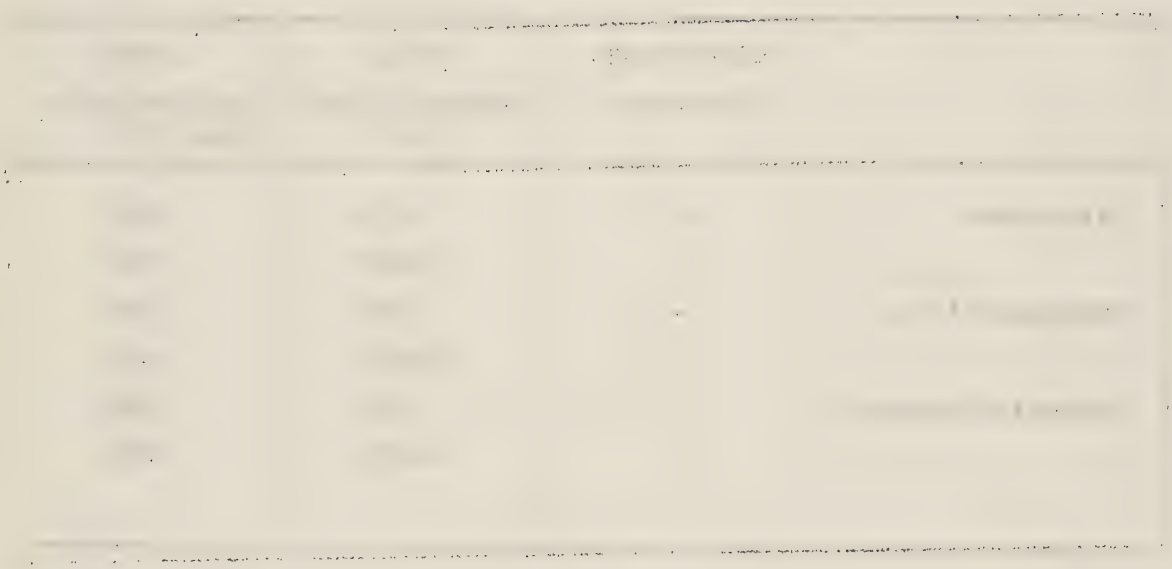
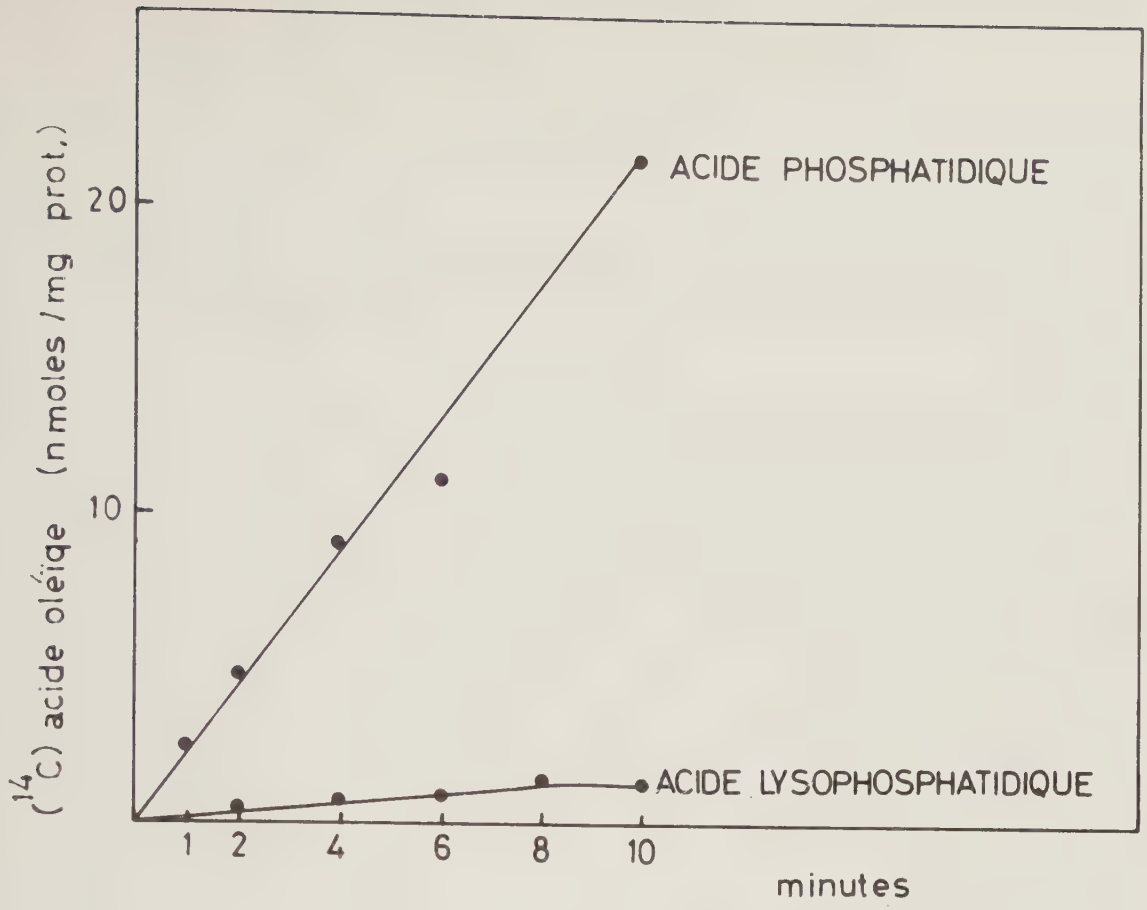


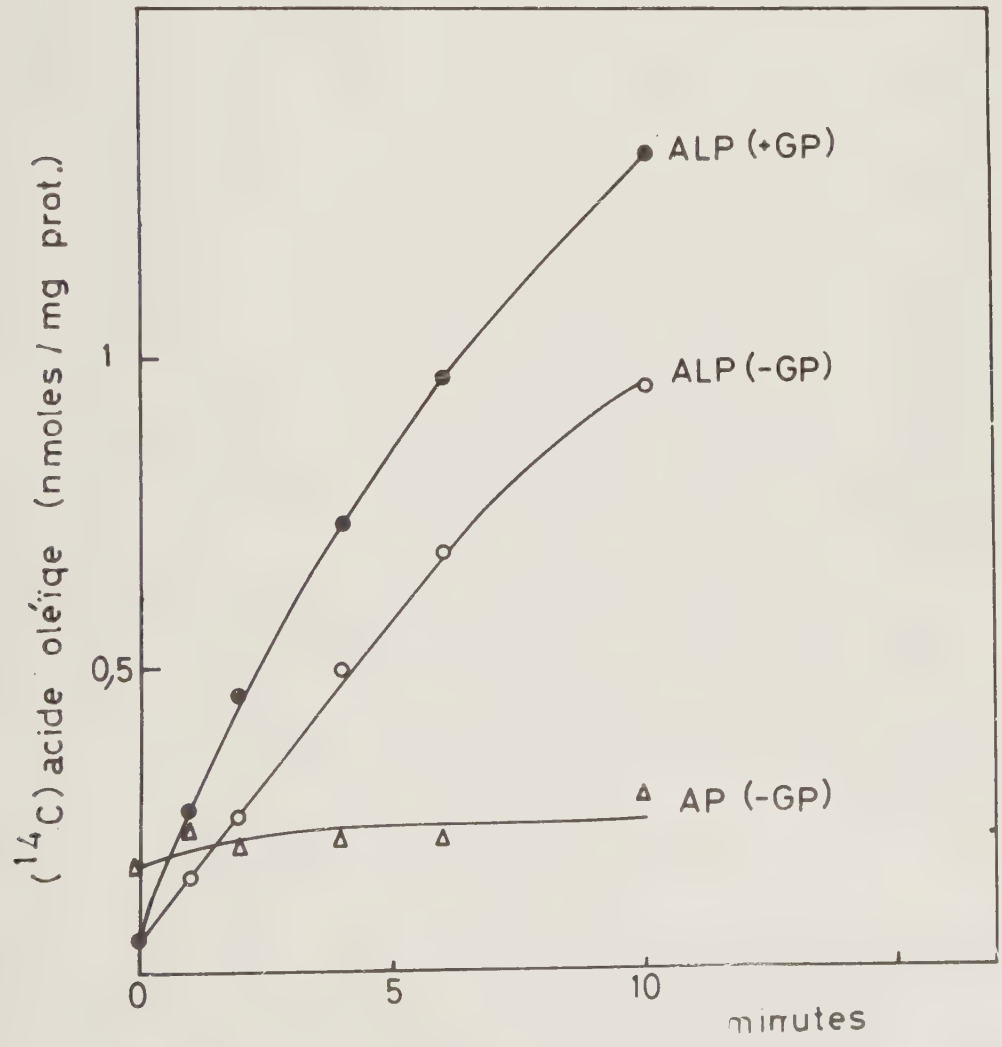
FIGURE 19 : INCORPORATION D'ACIDE (^{14}C) OLEIQUE DANS LES ACIDES PHOSPHATIDIQU
(AP) ET LYSOPHOSPHATIDIQUES (ALP)

A - Microsomes en présence de glycérol-3-phosphate 5 mM

B - Membranes externes en présence ou non de glycérol-3-phosphate
(GP) 5 mM

Conditions d'incubation identiques à celles du tableau 17


ACIDE PHOSPHATIDIQUE
ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE
(14C) acide oléïqe (n moles / mg prot.)
20
10
1
2
4
6
8
10
minutes


ALP (+GP)
ALP (-GP)
AP (-GP)
(14C) acide oléïqe (n moles / mg prot.)
1
0,5
0
5
10
minutes

B. Rôle de la phospholipase A mitochondriale dans la formation d'acide lysophosphatitique

La partie phosphate de la molécule d'acide phosphatidique est sujette à des cycles de phosphorylation-déphosphorylation au niveau de la membrane externe mitochondriale. En effet, en présence (^{32}P)-ATP on constate que seules les préparations de membranes externes sont capables d'incorporer du (^{32}P) phosphate dans l'acide phosphatidique (Figure 20) ce qui est en accord avec les observations de ZBOROWSKI et WOJTCZAK (151), les microsomes et les membranes internes ne semblant pas posséder les enzymes nécessaires pour réaliser cette opération. Cette incorporation de (^{32}P) phosphate est inhibée par le calcium et par le mélange acide oléique plus CoA. Cette inhibition n'est pas due à une dégradation rapide de l'acide phosphatidique formé puisque bien que l'incorporation se poursuive au même rythme pendant 20 minutes, la quantité incorporée en 7 minutes reste constante durant les 10 minutes suivant l'addition de calcium ou d'acide oléique et de CoA (Tableau 19). L'inhibition de la phosphatidate phosphohydrolase (152) par les acyl-CoA peut expliquer l'effet des acides gras et du CoA. D'autre part si le calcium inhibe l'incorporation de (32P)phosphate probablement en formant un complexe Ca - ATP inactif, il n'entraîne pas la formation d'acide lysophosphatidique par son action activatrice sur la phospholipase A mitochondriale. Ceci conduit à supposer que cette dernière enzyme n'est pas impliquée dans la formation d'acide lysophosphatidique. Si la phospholipase A mitochondriale ne semble pas participer directement au métabolisme de l'acide phosphatidique, on peut penser qu'elle peut participer à la régulation de ce métabolisme ; les produits ou les cofacteurs de cette enzyme (calcium et acides gras) inhibent les enzymes catalysant l'incorporation de phosphate dans l'acide phosphatidique et réciproquement (effet de l'ATP sur la phospholipase A (34)).

FIGURE 20 : RADIOCHROMATOGRAMMES OBTENUS APRES INCUBATION EN PRESENCE DE (^{32}P) ATP DE :

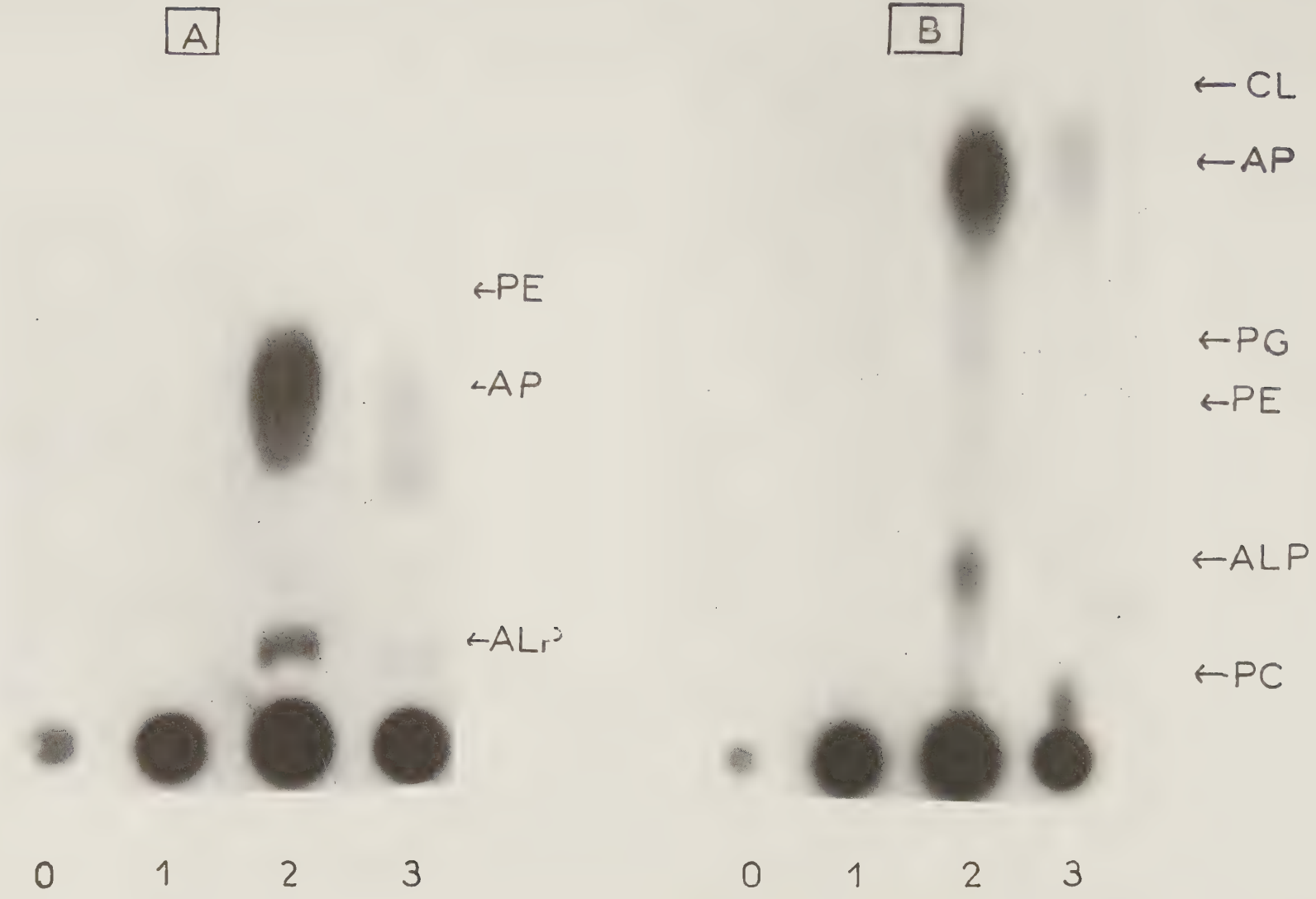
1) -membranes internes, 2) - membranes externes, 3) - microsomes

Conditions d'incubation cf. tableau 19

Systèmes de développement : A - $CHCl_3$, CH_3OH, CH_3COOH, H_2O (65:13:8:0,3 v/v)

B - $CHCl_3$, CH_3OH, NH_4OH 7N (76:30:6 v/v)

sur plaque de Silica gel H désactivée par $(NH_4)_2SO_4$


A
←PE
←AP
←ALP
0
1
2
3
B
←CL
←AP
←PG
←PE
←ALP
←PC
0
1
2
3

T A B L E A U XIX

Formation d'acide phosphatidique et d'acide lysophosphatidique marqués par (^{32}P) dans les mitochondries et les microsomes de foie de rat en présence de -(^{32}P)-ATP. Effet du calcium.

Le milieu d'incubation de base contient : glutamate de sodium 10 mM, NaF 30 mM, $MgCl_2$ 0,25 mM, tampon Tris-maléate 20 mM pH 7,8, -(^{32}P)ATP 0,4 mM (3200 d.p.m/nmole) et 6 mg de protéines dans un volume final de 1 ml. Lorsque indiqué, $CaCl_2$ 2 mM ou CoA 0,5 mM + acide oléique 1 mM sont ajoutés.

	Durée de l'incubation (min.)	Additions	(^{32}P) acide phosphatidique	(^{32}P) acide lysophosphatidique
			(pmole/mg de protéines)	
Mitochondries	10	-	231	45
	20	-	465	30
	10	Ca^{++}	36	4
	10* + 10	Ca^{++}	251	29
	10	CoA + Ac. ol.	25	ND
Microsomes	10	-	150	75
	20	-	310	46
	10	Ca^{++}	76	10
	10* + 10	Ca^{++}	129	28

* 10 minutes de préincubation avant l'addition de calcium

III. DISCUSSION DU CHAPITRE IV ET CONCLUSION

Les lysophosphatides ayant un effet lytique sur les membranes, la réacylation de ces composés est l'un des mécanismes envisageables permettant des contrôles in situ l'activité d'une phospholipase A membranaire. Dans le cas des mitochondries, l'incorporation d'acides gras dans les principaux phospholipides n'est pas catalysée par des enzymes mitochondriales. Dans le cas des membranes plasmiques, l'existence d'une lysophospholipide acyl transférase est controversée (84, 153). Si donc, en ce qui concerne certaines membranes subhépatocytaires, l'existence de cycles de déacylation-réacylation des phospholipides peut être mise en doute, il en est de même pour d'autres membranes biologiques. Dans les bactéries, par exemple (154,155), les phospholipases A et les acylases sont situées sur des membranes différentes. Il semble donc que, d'une façon générale, la régulation des activités phospholipasiques A membranaires ne puisse se faire à l'aide de la réaction inverse, tout au moins de façon simple. Il est nécessaire d'envisager que les lysophosphatides formés par action de la phospholipase sont échangés contre des molécules de phospholipides provenant d'autres parties de la cellule, à l'aide par exemple d'un mécanisme similaire à celui découvert par WIRTZ et ZIMVERSMITT (156) en ce qui concerne les échanges de phospholipides entre mitochondries et microsomes. La présence d'un inhibiteur des phospholipases A membranaires pourrait être un autre moyen de réguler leur activité.

Comme cela a été observé par d'autres auteurs, les mitochondries sont capables d'incorporer des acides gras dans du glycérol-3-phosphate pour donner des acides phosphatidiques (64, 145, 151, 157, 158) et lysophosphatidiques (159). L'accumulation d'acide lysophosphatidique n'est pas due à l'action de la phospholipase A mais plutôt à l'absence de l'enzyme catalysant l'acylation de l'acide lysophosphatidique. Selon LANDS et HART (160), cette dernière enzyme serait exclusivement localisée dans les microsomes. Comme dans le cas précédent, il est nécessaire d'envisager la coopération d'une autre organelle subcellulaire (les microsomes) pour réaliser l'acylation ultérieure de l'acide lysophosphatidique mitochondrial.

Le fait que les acides phosphatidiques et lysophosphatidiques aient une vitesse de renouvellement élevée au niveau de la membrane externe mitochondriale suggère que ces phospholipides ont un rôle spécial à jouer. Les résultats obtenus à l'heure actuelle ne permettent pas de préciser ce rôle et de savoir si ces composés sont impliqués dans des phénomènes membranaires tels que les phénomènes de transport (161) ou s'ils sont activement synthétisés en raison simplement de leur position centrale dans le métabolisme des phospholipides.

En ce qui concerne les microsomes, aucune accumulation d'acide lysophosphatidique n'est observée au cours de la synthèse d'acide phosphatidique à partir de glycérol-3-phosphate. Cette remarque, également faite par d'autres auteurs (162), permet de penser que le complexe enzymatique microsomial qui catalyse l'acylation du glycérol-3-phosphate le fait sans que le produit intermédiaire qu'est l'acide lysophosphatidique soit libéré. D'autre part comme dans le cas des mitochondries, la phospholipase des microsomes ne semble pas agir sur l'acide phosphatidique.

En conclusion, il semble difficile à l'heure actuelle d'attribuer un rôle bien défini aux phospholipases A membranaires. Si elles ne participent pas à des cycles de déacylation-acylation des phospholipides, cycles qui permettraient de modifier localement et rapidement les propriétés des membranes, on peut cependant envisager qu'elles interviennent lors des fusions intermembranaires. Ces fusions sont des phénomènes relativement lents, ce qui semble compatible avec la vitesse d'action des phospholipases A et, a priori, ne doivent pas être suivies immédiatement d'une réacylation des lysophospholipides formés. Les résultats obtenus par LUCY (12) concernant l'induction de fusions intermembranaires par addition de lysolécithine exogène rendent cette hypothèse des plus plausibles.

RESUME

1. L'existence de phospholipases A a été recherchée dans les mitochondries, les lysosomes, les microsomes et les membranes plasmiques de foie de rat. Quelques faits concernant l'acylation des phospholipides mitochondriaux sont également présentés.

2. Ces études ont nécessité la mise au point de techniques permettant d'une part de caractériser les préparations subcellulaires obtenues et d'autre part d'obtenir des fractions aussi pures que possible. Le cas des mitochondries a été examiné plus particulièrement et deux méthodes ont été utilisées (méthode basée sur la diminution de densité des lysosomes provoquée par le TRITON WR 1339 et méthode utilisant l'action de la digitonine sur les membranes riches en cholestérol).

3. A partir de mitochondries purifiées, les membranes de ces organelles ont été isolées selon les méthodes proposées par PARSONS et SCHNAITMAN. La nécessité de purifier les mitochondries avant d'entreprendre une telle séparation a été montrée : les membranes de lysosomes et celles du réticulum endoplasmique ont en effet des caractéristiques de sédimentation voisines de celles des membranes externes mitochondriales.

4. A l'exception des phospholipases acides lysosomiales (A_1 et A_2) toutes les activités phospholipasiques présentes dans les organelles subcellulaires de foie de rat sont liées aux membranes ; leur pH optimum d'activité est supérieur à 8,5 ; la présence de $CaCl_2$ et de KCl augmente l'activité.

5. L'activité phospholipasique des membranes de lysosomes est de type A_2. Le Km apparent est de 120 µM. Cette activité est accompagnée d'une importante activité phosphatasique acide.

6. Dans le réticulum endoplasmique l'activité phospholipasique est essentiellement de type A_1 et a un Km apparent de 300 μM.

7. L'activité phospholipasique des membranes plasmiques est de type A_1. Au dessus d'une concentration de 5 mM il n'y a plus de stimulation par $CaCl_2$. Le Km apparent est de 40 μM.

8. L'activité phospholipasique mitochondriale est de type A_2. Elle est présente dans la membrane externe comme dans la membrane interne. Cette enzyme hydrolyse essentiellement les phospholipides endogènes. Le fait que les Km apparents des activités phospholipasiques dans les membranes externes et internes soient différents (90 et 400 μM respectivement) n'est pas un argument suffisant pour conclure à l'existence de deux phospholipases A_2 mitochondriales distinctes.

9. Les phospholipases A_2 membranaires hydrolysent préférentiellement les liaisons esters d'acide arachidonique et les phospholipases A_1 celles d'acide palmitique.

10. La phospholipase A_2 mitochondriale ne participe pas directement à des cycles d'acylation-déacylation des principaux phospholipides mitochondriaux (phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine), les lysophosphatides formés par son action n'étant pas réacylés in situ.

11. La phospholipase mitochondriale n'est pas responsable de l'accumulation d'acide (^{14}C) lyso-phosphatidique lorsque les mitochondries sont incubées en présence d'acide (^{14}C) oléique. En effet, après incorporation de (^{32}P) phosphate dans l'acide phosphatidique (au niveau de la membrane externe) l'addition de calcium (activateur de la phospholipase) n'entraine pas la formation d'acide lyso-phosphatidique.

12. Ces résultats indiquent que la phospholipase A mitochondriale a un rôle relativement passif dans le renouvellement des phospholipides cellulaires. Elle pourrait avoir cependant un rôle à jouer dans les phénomènes de fusion intermembranaire.

SUMMARY

1. A study has been made of the occurence of phospholipases A in rat liver mitochondria, lysosomes, microsomes and plasma membranes. Some related observations on the re-acylation of mitochondrial phospholipids are also presented.

2. These studies needed techniques for the characterization and the purification of the subcellular fractions tested. Attention has been focused on mitochondrial preparations and two methods had been used, one using the effect of Triton WR 1339 on the density of lysosomes, the other using the action of digitonin on cholesterol rich membranes.

3. Mitochondrial membranes had been prepared from purified mitochondrial fractions, according to PARSONS and SCHNAITMAN. It is shown that it is necessary to previously purify mitochondria since lysosomal and endoplasmic reticulum membranes behave similarily to outer mitochondrial membranes.

4. Soluble phospholipases (pH optimum 4.5) occur only in lysosomes. Membrane-bound phospholipases in mitochondria, microsomes, plasma membrane and lysosomes have an alkaline pH optimum (pH 8.5-9.0).

5. The soluble lysosomal phospholipase activity is inhibited by KCl + $CaCl_2$. In contrast, the membrane-bound phospholipases are all stimulated by KCl + $CaCl_2$, there being an absolute requirement for Ca^{++} ions in the case of mitochondrial and plasma membrane activities.

6. The acid phospholipases in lysosomes show A_1 and A_2 specificity. The alkaline phospholipases in microsomes and plasma membrane have a predominant A_1 specificity while that in mitochondria is an A_2 phospholipase.

7. The membrane-bound enzymes show characteristic differences in affinity for exogenous substrate. The affinity for exogenous phosphatidylethanolamine is higher in plasma membrane (K_m = 40 µM) and outer mitochondrial membrane (90 µM) than in inner mitochondrial membrane and rough endoplasmic reticulum (K_m = 400 µM). In mitochondria, endogenous phosphatidylethanolamine is hydrolyzed preferentially to added (^{32}P) phosphatidylethanolamine.

8. The distribution of phospholipase A activity was studied in inner and outer mitochondrial membranes isolated by two different procedures. Although the distribution of phospholipase A_2 follows that of monoamine-oxidase a significant activity was found in isolated inner membrane freed of matrix proteins. The mitochondrial phospholipase A_2 cannot be exclusively attributed to the outer membrane.

9. The labelling, by (^{14}C)-oleic acid, of mitochondrial membrane phosphatidylethanolamine and lecithin can be accounted for by microsomal contamination of the mitochondria. In contrast microsomes were less active than mitochondrial outer membrane in the synthesis of phosphatidic acid from (^{32}P)-ATP.

10. Acylation of glycerophosphate produced phosphatidic acid with microsomes and lysophosphatidic acid with outer mitochondrial membrane. Accumulation of lysophosphatidic acid is attributed to a lack of acylating enzyme in the outer membrane rather than to the result of mitochondrial phospholipase action.

11. These results, in agreement with some others, point to a relatively passive role of mitochondria vis-à-vis structures like endoplasmic reticulum and plasma membrane in the renewal of cellular phospholipids : both as concerns an inability to attack exogenous substrate as well as a failure to re-acylate major structural components such as phosphatidyl-choline and phosphatidylethanolamine. An exception to this rule may, however, be found in pathways involving minor "non-structural" components such as lysophosphatidic acid.

BIBLIOGRAPHIE

[1] D.E. GREEN et S. FLEISCHER
Biochim. Biophys. Acta 70 (1963) 554

[2] G.B. ANSELL et J.N HAWTHORNE
dans BBA Library, Phospholipids, vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 1964, pp 152 et 244

[3] W. BARTLEY
dans Metabolism and Physiological Significance of Lipids, R.M.C DAWSON et D.N. RHODES Edrs, Wiley, Londres, 1964, p. 369

[4] L.L.M. Van DEENEN
dans Progress in the Chemistry of Fats and others Lipids, Vol. 8, Pergamon Press, Oxford, 1966, p.1

[5] G. ROUSER, G.J. NELSON, S. FLEISCHER et G. SIMON
dans Biological Membranes, D. CHAPMAN Edr, Academic Press, N.Y., 1968, p. 5

[6] L. ERNSTER et B. KUYLENSTIERNA
dans Mitochondria Structure and Function, 5th FEBS Symp., Prague 1968, Vol. 17, Academic Press, N.Y., 1969, p. 5

[7] E.D. KORN
Ann. Rev. Biochem. 38 (1969) 263

[8] D. CHAPMAN et R.B. LESLIE
dans Membranes of Mitochondria and Chloroplasts, ACS Monograph, E. RACKER Edr, Van Nostrand Reinhold Co., N.Y., 1970, p. 91

[9] G.S. GETZ
Adv. Lipid Res. 8 (1970) 175

[10] A.D. BANCHAM et R.W. HORNE
J. Mol. Biol. 8 (1964) 660

[11] D.A. HAYDON et J. TAYLOR
Theoret. Biol. 4 (1963) 281

[12] J.J. HOWELL et J.A. LUCY
FEBS Letters 4 (1969) 147

[13] C.J. SCANDELLA et A. KORNBERG
Biochem. 10 (1971) 4447

[14] P.M. VIGNAIS, P.V. VIGNAIS et A.L. LEHNINGER
J. Biol. Chem. 239 (1964) 2011

[15] C.R. ROSSI, L. SARTORELLI, L. TATO et N. SILIPRANDI
Arch. Biochem. Biophys. 107 (1964) 170

[16] P.V. VIGNAIS et P.M. VIGNAIS
dans Regulation of Metabolic Process in Mitochondria, J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello et E.C. Slater Edrs, Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 368

[17] D.E. GREEN et A. TZAGOLOFF
J. Lipid Res. 7 (1966) 587

[18] A.L. LEHNINGER et L.F. REMMERT
J. Biol. Chem. 234 (1959) 2459

[19] L. WOJTCZAK et A.L. LEHNINGER
Biochim. Biophys. Acta 51 (1961) 442

[20] P.M. VIGNAIS et J. NACHBAUR
Bull. Soc. Chim. Biol. 50 (1968) 1473

[21] P.M. VIGNAIS et J. NACHBAUR
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 307

[22] J. NACHBAUR et P.M. VIGNAIS
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 315

[23] P.M. VIGNAIS, J. NACHBAUR, P.V. VIGNAIS et J. ANDRE
FEBS Symp., Vol. 17, Academic Press, N.Y., 1969, p.17

[24] J. NACHBAUR et P.M. VIGNAIS
5° FEBS Meeting, Prague, 1968, Abstract n° 641

[25] J. NACHBAUR, A. COLBEAU et P.M. VIGNAIS
6° FEBS Meeting, Madrid, 1969, Abstract n° 202

[26] J. NACHBAUR, A. COLBEAU et P.M. VIGNAIS
FEBS Letters 3 (1969) 121

[27] J. NACHBAUR, A. COLBEAU et P.M. VIGNAIS
C.R. Acad. Sci. Paris, 272 (1971) 1015

[28] P.M. VIGNAIS, J. NACHBAUR, A. COLBEAU et P.V. VIGNAIS
dans Membrane Bound Enzymes, Plenum press, N.Y., 1971, p. 87

[29] A. COLBEAU, J. NACHBAUR et P.M. VIGNAIS
Biochim. Biophys. Acta 249 (1971) 462

[30] J. NACHBAUR, A. COLBEAU et P.M. VIGNAIS
en préparation

[31] P. BJØRNSTAD
J. Lipid Res. 7 (1966) 612

[32] G.L. SCHERPHOF, M. WAITE et L.L.M. Van DEENEN
Biochim. Biophys. Acta 125 (1966) 406

[33] M. WAITE et L.L.M. Van DEENEN
Biochim. Biophys. Acta 137 (1967) 498

[34] M. WAITE
Biochemistry 8 (1969) 2536

[35] A. MELLORS et A.L. TAPPEL
J. Lipid Res. 10 (1967) 479

[36] Y.E. RAHMAN, J. VERHAGEN et D. WIEL
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38 (1970) 670

[37] M. WAITE, G.L. SCHERPHOF, F.M.G. BOSHOUWERS et L.L.M. Van DEENEN
J. Lipid Res. 10 (1969) 411

[38] W. STOFFEL et H. GRETEN
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 1145

[39] R. FRANSON, M. WAITE et M. LA VIA
Biochemistry 10 (1971) 1942

[40] S. FOWLER et C. de DUVE
J. Biol. Chem. 244 (1969) 471

[41] O. TORQUEBIAU-COLLARD, M. PAYSANT, R. WALD et J. POLONOWSKI
Bull. Soc. Chim. Biol. 52 (1970) 1061

[42] J.D. NEWKIRK et M. WAITE
Biochim. Biophys. Acta 225 (1971) 224

[43] E.J. VICTORIA, L.M.G. Van GOLDE, K.Y. HOSTETLER, G.L. SCHERPHOF et L.L.M. Van DEENEN
Biochim. Biophys. Acta 239 (1971) 443

[44] L.M.G. Van GOLDE, B. FLEISCHER et S. FLEISCHER
Biochim. Biophys. Acta 249 (1971) 318

[45] P. BJØRNSTAD
Biochim. Biophys. Acta 116 (1966) 500

[46] G.H. HOGEBOOM
Dans Methods in Enzymology, Acad. Press, N.Y., 1955, Vol. 1, p. 16

[47] J. MOLNAR
Biochemistry 6 (1967) 3064

[48] D.M. NEVILLE Jr.
Biochim. Biophys. Acta 154 (1968) 540

[49] D.F. PARSONS et G.R. WILLIAMS
dans Methods in Enzymology, Acad. Press, N.Y., 1966, Vol. 10, p. 443

[50] C. SCHNAITMAN, V.G. ERWIN et J.W. GREENAWALT
J. Cell. Biol. 32 (1967) 719

[51] A.G. GORNALL, C.J. BARDAWILL et M.M. DAVID
J. Biol. Chem. 177 (1949) 751

[52] A. KRÖGER et M. KLINGENBERG
Biochem. Z. 338 (1969) 674

[53] O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. PANDALD
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265

[54] B. ZACH et J. COHEN
Clin. Chim. Acta 6 (1961) 665

[55] E. LAGNE
dans Methods in Enzymology, Acad. Press, N.Y., Vol. 3, 1957, p. 447

[56] F. APPELMANS, R. WATTIAUX et C. de DUVE
Biochem. J. 59 (1955) 438

[57] C.W. TABOR, H. TABOR et S.M. ROSENTHAL
dans Methods in Enzymology, Acad. Press, N.Y., Vol. 2, 1955, p. 390

[58] T. OMURA, P. SIEKEVITZ et G.E. PALADE
J. Biol. Chem. 242 (1967) 2389

[59] C. de DUVE, B.C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX et F. APPELMANS
Biochem. J. 60 (1955) 604

[60] C.H. FISKE et Y. SUBBA-ROW
J. Biol. Chem. 66 (1925) 375

[61] K. LINDHART et K. WALTER
dans Methods in Enzymatic Analysis, Acad. Press, N.Y., 1963, p. 783

[62] K.S. DOGSON, B. SPENCER et J. THOMAS
Biochem. J. 59 (1955) 29

[63] P. EMMELOT, C.J. BOS, E.L. BENEDETTI et P. RUMKE
Biochim. Biophys. Acta 90 (1964) 126

[64] C.H. LEA, D.N. RHODES et R.D. STOLL
Biochem. J. 60 (1955) 353

[65] A.G. ULSAMMER et J.L. GLENN
Biochim. Biophys. Acta 125 (1966) 525

[66] J. FOLCH, M. LEES, et G.H. SLOANE-STANLEY
J. Biol. Chem. 226 (1957) 497

[67] G.R. BARTLETT
J. Biol. Chem. 234 (1958) 466

[68] R.T. HOLMAN et J.J. RAHM
dans Progress in the Chemistry of Fats and others Lipids, Pergamon Press, 1966, Vol. 9, p. 15

[69] H.H. HOFFETETTER, N. SEN et R.T. HOLMAN
J.Am. Oil Chem. Soc. 42 (1965) 537

[70] E. STAHL
dans Thin Layer Chromatography, Acad. Press, N.Y., 1965

[71] G. ROUSER, S. FLEISCHER et A. YAMAMOTO
Lipids 5 (1970) 494

[72] V.P. SKIPSKY et M. BARCLAY
dans Methods in Enzymology, Acad. Press, N.Y., 1969, Vol. 14, p. 531

[73] D.F. PARSONS, G.R. WILLIAMS et B. CHANCE
Ann. N.Y. Acad. Sci. 137 (1966) 643

[74] D.F. PARSONS, G.R. WILLIAMS, W. THOMPSON, D.F. WILSON et B. CHANCE
dans Proc. Round Table Discussion on Mitoch. Struct. and Compartm., Adriatica Editrice, 1966, Bari.

[75] D.E. GREEN, D.W. ALLMAN, R.A. HARRIS et W.C. TAN
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31 (1968) 368

[76] D.W. ALLMAN, E. BACHMAN, N. ORME-JONHSON, W.C. TAN et D.E. GREEN
Biochem. Biophys. Res. Commun. 125 (1968) 981

[77] C. de DUVE
dans Subcellular Particles, T. Hayashi Edr, N.Y., 1959, p. 128

[78] P.L. SAWANT, S. SHIBKO, U.S. KUMTA et A.L. TAPPEL
Biochim. Biophys. Acta 85 (1964) 82

[79] F.M. BACCINO, G.A. RITA et M.F. ZURETTI
Biochem. J. 122 (1971) 363

[80] P. BAUDHUIN, H. BEAUFAY, Y. RAHMAN-LY, O. SELLINGER, R. WATTIAUX, P. JACQUES et C. de DUVE
Biochem. J. 92 (1963) 179

[81] A.H. PHILLIPS et R.G. LANGDON
J. Biol. Chem. 237 (1962) 2652

[82] G. BRUNNER et F.L. BYGRAVE
Européan J. Biochem. 8 (1969) 530

[83] C. ARSENIS et O. TOUSTER
J. Biol. Chem. 243 (1968) 5702

[84] H.D. KAULEN, R. HENNIG et W. STOFFEL
Hoppe-Syler's Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 1555

[85] R. WATTIAUX, M. WIBO, et P. BAUDHUIN
dans Lysosomes, Ciba Found. Symp. J. et A. Churchill Edr., Londres 1963, p. 176

[86] F.S. SJOSTRAND
Nature (Londres) 171 (1953) 30

[87] G.E. PALADE
Anat. Rec. 114 (1952) 427

[88] P. WLODAWER, D.F. PARSONS, G.R. WILLIAMS et L. WOTJCZAK
Biochim. Biophys. Acta 128 (1966) 34

[89] C. SCHNAITMAN et J.W. GREENAWALT
J. Cell Biol. 38 (1968) 158

[90] M. LEVY, R. TOURY et J. ANDRE
Biochim. Biophys. Acta 135 (1967) 599

[91] H. EIBL, E.E. HILL et W.E.M. LANDS
Européan J. Biochem. 9 (1969) 250

[92] W. STOFFEL et H.G. SCHIEFFER
Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 1017

[93] J. LOWENSTEIN, H.R. SCHOLTE et E.M. WIT-PEETERS
Biochim. Biophys. Acta 223 (1970) 432

[94] L.L.M. Van DEENEN et G.H. de HAAS
Ann. Rev. Biochem. 35 (1966) 157

[95] C. DELEZENNE et E. FOURNEAU
Bull. Soc. Chim. France 15 (1914) 421

[96] M.A. WELLS
Biochemistry 10 (1971) 4074

[97] R.A. SHIPOLINI, G.L. CALLEWAERT, R.C. COTTRELL, S. DOONAN, C.A. VERNON et B.E.C. BANKS
European J. Biochem. 20 (1971) 459

[98] N.H. TATTRIE
J. Lipid Res. 1 (1959) 60

[99] D.J. HANAHAN, H. BROCKERHOFF et E.J. BARON
J. Biol. Chem. 235 (1960) 1917

[100] G.H. de HAAS et L.L.M. Van DEENEN
dans The Enzymes of Lipid Metabolism, P. Desnuelle Edr., Pergamon Press, London, 1961, p. 53

[101] C. LONG, R. ODAVIC, et E.J. SARGENT
Biochem. J. 87 (1963) 13 P

[102] O. HAYAISHI
Feder. Proc. 12 (1953) 216

[103] O. HAYAISHI et A. KORNBERG
J. Biol. Chem. 206 (1964) 647

[104] H. OKUYAMA et S. NOJIMA
Biochim. Biophys. Acta 176 (1969) 120

[105] Y. ONO et S. NOJIMA
Biochim. Biophys. Acta 176 (1969) 111

[106] V. GRONCHI
Sperimentale 90 (1936) 223

[107] W.L. MAGGEE, J. GALLAI-HATCHARD, H. SANDERS et R.H.S. THOMPSON
Biochem. J. 83 (1962) 17

[108] M.F. COOPER et G.R. WEBSTER
J. Neurochem. 17 (1970) 1543

[109] G.R. WEBSTER
Biochem. J. 117 (1970) 10 P

[110] S. GATT et Y. BARENHOLZ
dans Methods in Enzymology, Vol. 14, 1969, p. 167

[111] G.H. de HAAS, A.J. SLOTBOOM, P.P.M. BONSEN, L.L.M. Van DEENEN, S. MAROUX, A. PUIGSERVER et P. DESNUELLE
Biochim. Biophys. Acta 221 (1970) 31

[112] J. LLOVERAS, L. DOUSTE-BLAZY et P. VALDIGUIE
Cr. Acad. Sci. Paris 256 (1963) 1861

[113] J. LLOVERAS et L. DOUSTE-BLAZY
Bull. Soc. Chim. Biol. 51 (1969) 981

[114] W.P. WEGLICKI, M. WAITE, P. SISSON et S.B. SHOHET
Biochim. Biophys. Acta 231 (1971) 512

[115] H. Van den BOSCH et L.L.M. Van DEENEN
Biochim. Biophys. Acta 84 (1964) 234

[116] G. SCHMIDT, M.J. BESSMAN et S.J. TANNHAUSER
Biochim. Biophys. Acta 23 (1957) 127

[117] B. EPSTEIN et B. SHAPIRO
Biochem. J. 71 (1959) 615

[118] A. OTTOLENGHI
J. Lipid Res. 5 (1964) 532

[119] J.J. GALLAI-HATCHARD et R.H.S. THOMPSON
Biochim. Biophys. Acta 98 (1965) 128

[120] W.C. VOGEL et L. ZIEVE
J. Lipid Res. 5 (1964) 177

[121] W.C. VOGEL et E.L. BIERMAN
J. Lipid Res. 8 (1967) 46

[122] R. INFANTE, K. KOURMANOV et J. POLONOVSKI
Biochim. Biophys. Acta 164 (1968) 436

[123] G.L. SCHERPHOF et L.L.M. Van DEENEN
Biochim. Biophys. Acta 98 (1965) 204

[124] C.R. ROSSI, L. SARTORELLI, L. TATO, L. BARETTA et N. SILIPRANDI
Biochim. Biophys. Acta 98 (1965) 207

[125] O.A. ROHOLT et M. SCHLAMOVITZ
Archiv. Biochem. Biophys. 94 (1961) 364

[126] G. BENZONANA et P. DESNUELLE
Biochim. Biophys. Acta 105 (1965) 121

[127] G.H. de HAAS, P.P.M. BONSEN, W.A. PIETERSON et L.L.M. Van DEENEN
Biochim. Biophys. Acta 239 (1971) 252

[128] P. DESNUELLE
Biochimie 53 (1971) 841

[129] H.O. HAUSER
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45 (1971) 1049

[130] G. DERVICHIAN
Biochimie 53 (1971) 25

[131] V.P. DOLE
J. Clin. Invest. 35 (1956) 150

[132] D.O. SHAH et J.H. SCHULMAN
J. Lipid Res. 8 (1967) 227

[133] A.D. BANGHAM et D. PAPAHADJOPOULOS
Biochim. Biophys. Acta 126 (1966) 181

[134] R.M.C. DAWSON
Biochem. J 88 (1963) 414

[135] R.M.C. DAWSON et A.D. BANGHAM
Biochem. J. 72 (1959) 493

[136] H. KIMIZUKA, T. NAKAHARA, H. UEJO et A. YAMAUCHI
Biochim. Biophys. Acta 137 (1967) 549

[137] C.R. HACKENBROCK
Proc. Nat. Acad. Sci. US 61 (1968) 598

[138] L. SALEM
Canad. J. Biochem. Phys. 40 (1962) 1287

[139] H.G. HEIDRICH, R. STAHN et K. HANNIG
J. Cell Biol. 46 (1970) 137

[140] M. WAITE et P. SISSON
Biochemistry 10 (1971) 237

[141] L.M.G. Van GOLDE, W.A. PIETERSON et L.L.M. Van DEENEN
Biochim. Biophys. Acta 152 (1968) 84

[142] J.C. VIDAL et A.O.M. STOPPANI
Arch. Biochem. Biophys. 147 (1971) 66

[143] M. DIXON et E.C. WEBB
dans Enzymes, Longman , Londres, 1964, p. 61

[144] M. WAITE et L.M.G. Van GOLDE
Lipids 3 (1968) 449

[145] F.B. JUNGALWALA et R.M.C. DAWSON
Biochem. J. 117 (1970) 481

[146] M. WAITE, L.L.M. Van DEENEN, T.J.C. RUIGROCK et P.F. ELBERS
J. Lipid Res. 10 (1969) 599

[147] K.R. NORUM, M. FARSTAD et J. BREMER
Biochem. Biophys. Res. Commun 24 (1966) 797

[148] D.W. YATES et P.B. GARLAND
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23 (1966) 460

[149] D.S. BEATTLE
Biochem. Biophys. Res. Commun 30 (1968) 57

[150] E.D. DUEE
Thèse Sciences, Grenoble, 1970

[151] K.W.A WIRTZ et D.B. ZILVERSMITT
Biochim. Biophys. Acta 193 (1969) 105

[152] J. ZBOROWSKI et L. WOJTCZAK
Biochim. Biophys. Acta 187 (1969) 73

[153] R. BRANDES et B. SHAPIRO
Biochim. Biophys. Acta 137 (1967) 202

[154] Y. STEIN, C. WIDNELL et O. STEIN
J. Cell. Biol. 39 (1968) 185

[155] M. BELL, R.D. MAVIS, M.J. OSBORN et P.R. VAGELOS
Biochim. Biophys. Acta 249 (1971) 628

[156] D.A. WHITE, F.R. ALBRIGHT, W.J. LENNARZ et C.A. SCHNAITMAN
Biochim. Biophys. Acta 249 (1971) 636

[157] K.W.A. WIRTZ et D.B. ZILVERSMITT
J. Biol. Chem. 243 (1968) 3596

[158] E.H. SHEPHARD et G. HUBSCHER
Biochem. J. 113 (1969) 429

[159] M.G. SARZALA, L.M.G. Van GOLDE, B. de KRUYF et L.L.M. Van DEENEN
Biochim. Biophys. Acta 202 (1970) 106

[160] L.N.W. DAAE et J. BREMER
Biochim. Biophys. Acta 210 (1970) 92

[161] W.E.M. LANDS et P. HART
J. Lipid Res. 5 (1964) 81

[162] L.E. HOKIN et M.R. HOKIN
Ann. Rev. Biochem. 32 (1963) 553

[163] H. OKUYAMA, H. EIBL et W.E.M. LANDS
Biochim. Biophys. Acta 248 (1971) 263

COMPLEMENT BIBLIOGRAPHIQUE

REPARTITION DES ACIDES GRAS SATURES ET INSATURES DANS LES MOLECULES PHOSPHOLIPIDIQUES

Les travaux de HANAHAN (164,165) ont montré que les acides gras saturés et insaturés sont situés à des endroits différents de la molécule de lécithine. Compte tenu de la spécificité de l'action de la phospholipase A de venin de serpent sur la liaison ester en position 2 (ou β) (164, 166, 167) il a été trouvé que les acides gras insaturés sont essentiellement situés à cet endroit de la molécule phospholipidique.

En conséquence, une phospholipase A_2 libérera essentiellement des acides gras insaturés et une phospholipase A_1 des acides gras saturés.

164 - D.J. HANAHAN
Lipid Chemistry, J. Wiley, N.Y et Londres, 1960

165 - D.J. HANAHAN et R. BLOMSTRAND
J. Biol. Chem. 222 (1956) 677

166 - G.H. de HAAS, I. de MULDER et L.L.M. van DEENEN
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3 (1960) 287

167 - N.H. TATTRIE et R. CYR
Biochim. Biophys. Acta 70 (1963) 693

ERRATA

Page 4, ligne 13
au lieu de .... Milwankee, lire .... Milwaukee

Page 5, ligne 1
au lieu de .... esthers, lire .... esters

Page 5, § 3
au lieu de .... Produits commerciaux, lire .... Produits non commerciaux

Page 15, ligne 4
au lieu de .... histidine-HCL, lire.... histidine-HCl

Page 19, ligne 2
au lieu de .... 0,074 nmoles, lire .... 0,074 µ moles

Page 19, ligne 4
au lieu de .... 0,144 nmoles, lire .... 0,144 µmoles

Page 20, ligne 15
au lieu de .... absorbé, lire .... adsorbé

Page 27, ligne 20
au lieu de ..... d'avantage, lire .... davantage

Page 32, ligne 6
au lieu de .... ne peut s'expliquer que par un enrichissement, lire.... ne peut s'expliquer seulement par un enrichissement

Page 43, ligne 21
au lieu de .... (voire page 39), lire .... (voir page 42)

Page 49, ligne 10
au lieu de .... (cf. page 24), lire .... (cf. page 28)

Page 64, ligne 13
au lieu de .... 7 minutes, lire .... 10 minutes

Page 65, ligne 4
au lieu de .... permettant des contrôles, lire .... permettant de contrôler

Page 65, ligne 18
au lieu de .... ZIMVERSMITT, lire .... ZILVERSMITT

VU

Grenoble, le

le Président de la thèse

G. DESSAUX

VU, et permis d'imprimer,

Grenoble, le

le Président de l'Université
Scientifique et Médicale

M. SOUTIF